

Jenna Ryhänen

# Happoanalyysimenetelmän kehitys ja validointi HPLC -laitteelle

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko (AMK)  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
15.10.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Jenna Ryhänen Happonalyysimenetelmän kehitys ja validointi HPLC -laitteelle 29 sivua + 3 liitettä 15.10.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Kemiallinen analytiikka
Ohjaaja(t)	Liisa Puro, Analyysi-insinööri TkT Mia Ruismäki Lehtori, Metropolia AMK
<p>Opinnäytetyö tehtiin Lappeenrannan teknillisellä Yliopistolla. Työn tarkoituksena oli kehittää HPLC–analyysimenetelmä mahdollisimman monen orgaanisen hapon samanaikaiseen määrittämiseen. Menetelmää käytettäisiin rutiinianalytiikassa. Menetelmässä käytettiin yhdisteiden erottamiseen ioniekskluusiokromatografiaa ja detektointiin kahta eri detektoria, UV ja RI. Toisena tehtävänä oli tehdä kirjallisuuskatsaus happojen määrittämiseen GC/FID:lla.</p> <p>Kehitettävä menetelmä optimoitiin ja validoitiin. Validoinnissa tutkittiin toteamis- ja määritysrajaa, lineaarista mittausaluetta, spesifisyyttä ja selektiivisyyttä, täsmällisyyttä, tarkkuutta, herkkyyttä ja mittausepävarmuutta.</p> <p>Työssä päädyttiin 16 hapon määrittämiseen. Laskennalliseksi toteamisrajaksi saatiin UV-detektorilla 0,7 ppm ja määritysrajaksi 2,3 ppm. RI-detektorilla toteamisraja oli 0,8 ppm ja määritysraja oli 2,5 ppm. Menetelmän lineaariseksi mittausalueeksi saatiin suurimmalle osalle hapoista 10 – 10 000 ppm. Spesifisyys- ja selektiivisyys-tulosten perusteella näyttematriisi häiritsee joidenkin happojen määrittämistä. Huono resoluutio ja näytteessä olevat epäpuhtaudet aiheuttivat suuria saantoprosentteja, jotka nostivat epävarmuutta. Menetelmä oli kuitenkin täsmällinen ja tarkka yksinkertaisella näytteellä.</p> <p>Validoitu menetelmä vaatii lisää kehittämistä luotettavan kvantitatiivisen 16 hapon määrittämiseksi HPLC:lla. Menetelmässä ei ollut laimennuksen ja suodatuksen lisäksi erillistä näytteenkäsittelyä. Näytteenkäsittelyn lisääminen menetelmään voi parantaa tuloksia.</p> <p>GC:lle löydettiin kolme erilaista ajo-menetelmää happojen määrittämiseksi FID:lla. Menetelmillä on analysoitu yhteensä 10 happoa, mutta useammankin hapon määrittäminen voi olla mahdollista.</p>	
Avainsanat	HPLC, UV, RI, ioniekskluusiokromatografia, GC, FID, validointi

Author(s) Title	Jenna Ryhänen Acid analysis method development and validation for HPLC
Number of Pages Date	29 pages + 3 appendices 15 October 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	Chemical Analysis
Instructor(s)	Liisa Puro, Analysis engineer, Dr. Sci (Tech.) Mia Ruismäki Senior Lecturer, Metropolia AMK
<p>This thesis was made at Lappeenranta University of Technology. The purpose was to develop a method that can analyze as many organic acids as possible with HPLC. The method would be used in routine analytics. In this method compound were separated using ion exclusion chromatography and detected with two different detectors, UV and RI. The second task was to make a literature review to determine acids by GC/FID.</p> <p>The developed method was optimized and validated. The parameters studied in validation were limits of detection and quantification, linearity, specificity and selectivity, precision, accuracy, sensitivity and measurement uncertainty.</p> <p>The work resulted in the determination of 16 acids. Calculated detection limit of 0.7 ppm and determination limit of 2.3 ppm was obtained with UV-detector. RI-detector detection limit was 0.8 ppm and determination limit was 2.5 ppm. Methods linear measurement range were majority of the acids 10 – 10 000 ppm. Based on the results of specificity and selectivity sample matrix interferes the determination of some acids. Weak resolution caused large recovery results that increased measurement uncertainty. However, the method was precise and accurate with a simple sample.</p> <p>Validated method requires more development to be reliable for quantitative determination of 16 acids by HPLC. The method did not include separate a sample process besides dilution and filtering. The results may improve by adding to the method sample process.</p> <p>For GC there was found three different methods to determinate acids with FID. The methods have been used to analyze in total of 10 acids but it may be possible to determine several more acids.</p>	
Keywords	HPLC, UV, RI, ion exclusion chromatography, GC, FID, validation

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Hapot	1
3	Näytteet	3
3.1	Puuhydrolysaatti	3
3.1.1	Selluloosa	3
3.1.2	Ligniini	4
3.1.3	Hemiselluloosa	4
3.2	Tuntematon	4
4	Analyysitekniikka	4
4.1	Nestekromatografia	4
4.1.1	Eluentti	5
4.1.2	Kolonne	6
4.1.3	Detektori	6
4.2	Kaasukromatografia	7
4.2.1	Liekki-ionisaatiodetektori	8
4.2.2	Menetelmiä orgaanisten happojen analysoimiseksi	8
5	Validointi	10
5.1	Optimointi	10
5.2	Toteamis- ja määrittäysraja	10
5.3	Lineaarisuus ja mittausalue	11
5.4	Spesifisyys ja selektiivisyys	12
5.5	Täsmällisyys	12
5.6	Tarkkuus	13
5.7	Herkkyys	13
5.8	Mittausepävarmuus	13
6	Tulokset	14
6.1	Optimointi	14

6.2	Toteamis- ja määrittäysraja	16
6.3	Lineaarinen mittausalue	16
6.4	Spesifisyys ja selektiivisyys	19
6.5	Täsmällisyys	20
6.6	Tarkkuus	21
6.7	Herkkyys	22
6.8	Mittausepävarmuus	23
7	Päätelmät	24
8	Yhteenveto	25
	Lähteet	27
	Liitteet	
	Liite 1. Residuaalit	
	Liite 2. Standardinlisäyssuorat	
	Liite 3. Saantokokeet	

## Lyhenteet

HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
GC	Kaasukromatografia ( <i>gas chromatography</i> )
UV	Ultravioletti ( <i>ultraviolet</i> )
RID	Taitekerroindetektorit ( <i>refractive index detector</i> )
FID	Liekki-ionisaatiodetektorit ( <i>flame ionization detector</i> )
LOD	Toteamisraja ( <i>limit of detection</i> )
LOQ	Määrittämisraja ( <i>limit of quantification</i> )
R-%	Saantoprosentti

## 1 Johdanto

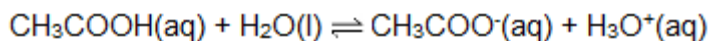
Opinnäytetyö tehtiin Lappeenrannan teknillisellä Yliopistolla. Mittaukset tehtiin kemiantekniikan osastolla analyysikeskuksen laboratoriossa. Analyysikeskuksella on laaja laitevalikoima, joka mahdollistaa erilaisten näytteiden analysoinnin. Se tarjoaa palvelujaan tutkimusryhmien ja yhteistyökumppaneiden tarpeisiin.[19]

Tavoitteena oli luoda menetelmä, jolla voi analysoida mahdollisimman monta happoa HPLC:lla. Työssä keskityttiin orgaanisten happojen analyysimenetelmän kehittämiseen. Näytteenä käytettiin kahta puuhydrolysaattia, joista toista on muunneltu. Kolmas näyte oli tuntematon. Toisena tavoitteena oli tehdä kirjallisuusselvitys mahdollisesta menetelmästä happojen määrittämiseksi GC:lla, kun detektorina on FID.

Aluksi kerrotaan lyhyesti hapoista ja käytettävistä näytteistä. Lisäksi kerrotaan korkean erotuskyvyn nestekromatografian ja kaasukromatografian toiminnasta sekä validoinnista ja työn kulusta. Lopussa esitetään tulokset ja päätelmät.

## 2 Hapot

Usein hapoista puhuttaessa tarkoitetaan Brønsted–Lowry-happoja, jotka luovuttavat protonin eli vetyionin  $H^+$ . [2] Tämä on mahdollista, jos reaktiossa on mukana emäs, joka voi ottaa sen vastaan. Reaktiota kutsutaan protolyysireaktioksi, jota alla oleva reaktio kuvaa.[20]



Esimerkissä etikkahappo reagoi veden kanssa, jolloin muodostuu asetaatti- ja oksoniumioni.[20]

Hapot voidaan jakaa epäorgaanisiin ja orgaanisiin happoihin. Orgaaniset hapot ovat orgaanisia yhdisteitä, joilla on happojen ominaisuuksia.[2] Tässä opinnäytetyössä keskitytään menetelmän kehittämiseen tavanomaisimpien orgaanisten happojen määrittämiseksi. Määritettävät hapot ovat taulukossa 1.

Taulukko 1. Määritettävät hapot

Triviaalinimi	IUPAC-nimi
Askorbiinihappo	2-okso-L-threo-hexono-1,4-laktoni-2,3-enedioli
Etikkahappo	Etaanihappo
Fumaarihappo	Trans-1,2-etyleenidikarboksyyliahappo
Galakturonihappo	2,3,4,5-tetrahydroksi-6-oksoheksaanihappo
Glukuronihappo	Tetrahydroksi-6-oksoheksaanihappo
Levuliinihappo	Hydroksipropaanihappo
Maitohappo	2-hydroksipropaanihappo
Maleiinihappo	Cis-buteenidihappo
Malonihappo	Propaanidihappo
Meripihkahappo	Butaanidihappo
Muurahaishappo	Metaanihappo
Oksaalihappo	Etaanidihappo
Omenahappo	Hydroksibutaanidihappo
Propionihappo	Propaanihappo
Sitruunahappo	2-hydroksi-1,2,3-propaanitrikarboksyyliahappo
Viinihappo	2,3 -dihydroksibutaanidihappo
Voihappo	Butaanihappo



### 3 Näytteet

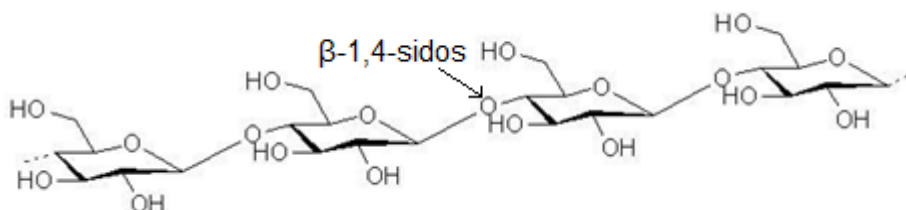
Näytteinä käytettiin kuumavesiuutettua puuhydrolysaattia ja kuumavesiuutettua puuhydrolysaattia, jota on muunneltu. Näin nähtiin pienen matriisin muutoksen vaikutus menetelmän toimivuuteen. Kolmas näyte on merkitty työssä tuntemattomaksi.

#### 3.1 Puuhydrolysaatti

Puuhydrolysaatti on liuos, jota saadaan hydrolysoimalla puuta. Kuumavesiuutossa puun sisältämistä rakennusaineista hemiselluloosa ja ligniini liukenevat veteen. Selluloosa pysyy hydrofobisena muuttumattomana.[14]

##### 3.1.1 Selluloosa

Selluloosa on pitkäketjuinen polysakkaridi, joka koostuu  $\beta$ -D-glukoosi molekyyleistä. Selluloosa antaa soluseinälle sen lujuuden ja kuidulle vetolujuuden.[15,23] Puussa selluloosaa on noin 50 %. Kuvassa 1 näkyy kuinka glukoosimolekyylit liittyvät toisiinsa  $\beta$ -1,4-sidoksilla.[21]



Kuva 1. Selluloosan glukoosipolymeeriketjua [22]

Kun  $\beta$ -1,4-sidoksilla muodostuneet ketjut liittyvät toisiinsa vetysidoksilla, syntyy selluloosan kuitumainen rakenne.[21]

### 3.1.2 Ligniini

Ligniini on kolmiolutteinen polymeeri, joka koostuu propyyli-fenoliyksköistä. Se sitoutuu hemiselluloosaan ja antaa puulle sen jäykkyyden. Ligniinin koostumus vaihtelee kasvista riippuen eikä sillä ole selvää rakennetta. Puun kuivapainosta ligniiniä on noin 20 – 30 %. [14,21,23]

### 3.1.3 Hemiselluloosa

Hemiselluloosa koostuu haaroittuneista polymeeriketjuista, joissa on lähinnä pentooseja (ksyloosia ja arabinoosia) ja heksooseja (glukoosia, mannoosia ja galaktoosia). Hemiselluloosa ei muodosta itseensä vetysidoksia niin kuin selluloosa, sen haaraisen rakenteen vuoksi. Se voi kuitenkin muodostaa sidoksia muiden molekyylien esimerkiksi selluloosan kanssa.[14,23] Kuumavesiuuton jälkeisissä jatkokäsittelyissä puuhydrolysaatista saadaan muun muassa happoja.[13]

## 3.2 Tuntematon

Tuntematon näyte on salassa pidettävä. Sen ominaisuuksista ei kerrota tässä työssä.

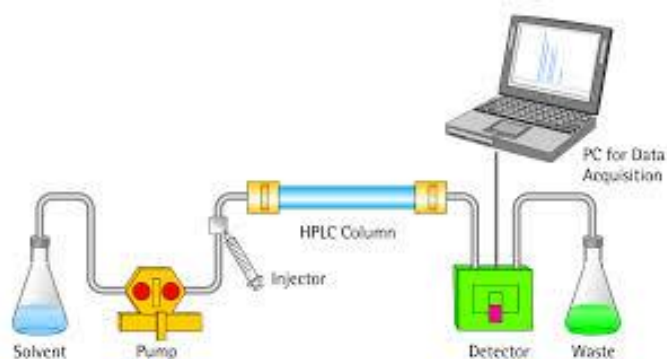
## 4 Analyysitekniikka

### 4.1 Nestekromatografia

HPLC eli *high performance liquid chromatography* käytetään orgaanisten ja epäorgaanisten yhdisteiden analysointiin. Sillä voidaan analysoida samanaikaisesti monta ainetta. Edellytyksenä on, että tutkittava näyte liukenee käytettävään eluenttiin. Myös

suurikokoisten molekyylien, kuten proteiinien ja aminohappojen analysointi on mahdollista nestekromatografialla.[1]

Nestekromatografia-laitteistoon kuuluu injektori, pumppu, kolonni ja detektori. Näistä kolonnin ja detektorin voi tarvittaessa termostoida. Kuvassa 2 on esitetty pelkistetty kuva HPLC-laitteistosta.[1]



Kuva 2. Nestekromatografian rakenne[17]

Näyte syötetään injektorin kautta kapillaariin, jossa korkeassa paineessa kulkeva neste-faasi kuljettaa näytteen kolonniin. Eluentti virtaa tasaisena virtana kolonnin läpi. Tämä mahdollistetaan pumpulla, joka pumppaa eluenttia sykkeettömästi korkean paineen alaisena. Kolonnissa yhdisteet erottuvat jakautumalla eri tavoin stationäärifaasiin ja liikkuvaan faasiin. Mitä kauemmin yhdisteet pidäytyvät stationäärifaasiin, sitä myöhemmin ne saapuvat detektorille. Detektori mittaa yhdisteen antaman signaalin ajan funktiona. Näytteessä olevien yhdisteiden HPLC:lla saatavien signaalien pinta-aloja verrataan standardiliuosten signaalien pinta-aloihin, jolloin saadaan selville näytteessä olevien yhdisteiden pitoisuus.[1,3,8,9]

#### 4.1.1 Eluentti

Eluenttina käytettiin rikkihappoa. Ennen eluentin käyttöä siitä poistettiin ilma ultraäänihauteessa. Suodatus tapahtui samanaikaisesti pumpun pumpatessa eluenttia.

#### 4.1.2 Kolonni

Ennen varsinaista analyysikolonnia käytettiin esikolonnia. Esikolonne suojaa varsinaista analyttistä kolonnia näytteiden sisältämiltä liukenemattomilta ja eluoitumattomilta komponenteilta. Tällöin analyttisen kolonnin käyttöikä pitenee.[1]

Happojen analysoinnissa käytettävä Varian MetaCarb 87H kolonne on suunniteltu orgaanisten ja epäorgaanisten happojen analysointiin. Sen erotusmekanismi on ioniekskluusiokromatografia.[18]

Ioniekskluusiokromatografiaa käytetään ionisoituvien ja neutraalien yhdisteiden erottamiseen. Siinä erottuminen tapahtuu sähköisten voimien avulla, ionien ja neutraalien molekyylien koon sekä niiden pidättyvyyteen kolonnin partikkeleihin. Stationäärifaasissa on varaus, johon neutraalit ja vastakkaismerkkiset ionit pidättyvät, jolloin niiden eteneminen on hidasta. Saman merkkiset ionit eivät pidäyty stationäärifaasiin vaan eluoituvat ensimmäisinä. Pienet ionit pidättyvät stationäärifaasin huokosiin, jolloin ne etenevät isokoisia ioneja nopeammin.[2]

#### 4.1.3 Detektori

Nestekromatografiassa ei ole yhtä hyvää yleisdetektoria, joten se pitää aina valita tutkittavien yhdisteiden mukaan. Siinä voidaan myös käyttää useaa detektoria samaan aikaan. Tässä menetelmässä käytetään UV- ja RI-detektoria.[1]

UV-Vis spektrofotometrillä mitataan näytteen läpi kulkeneen säteilyn intensiteetin suhde aallonpituuden funktiona. Sen toiminta perustuu Lambert-Beerin lakiin.[1]

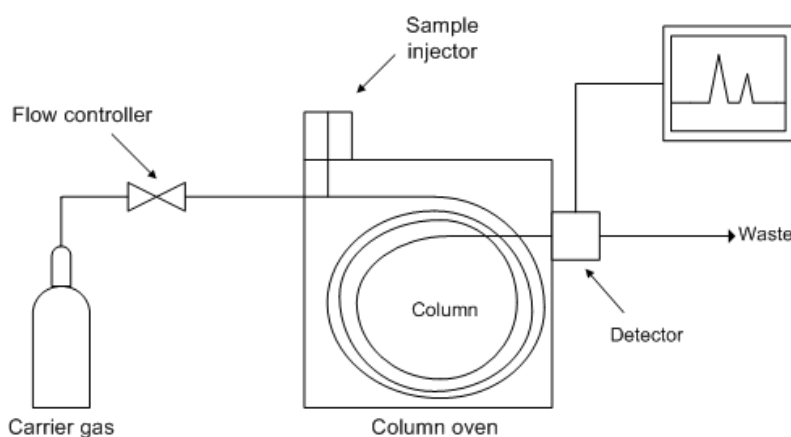
Taitekerroindetektorin eli RI-detektorin mittaa detektorin läpi virtaavan liuoksen taitekerrointa. Liuoksessa olevien tutkittavien yhdisteiden tiheys ja lämpötila vaikuttavat taite

kerroimeen. RI-detektori sopii kaikille yhdisteille, mutta sen haittapuolia ovat epäherkkyys ja häiriöalttius. Lisäksi sitä ei voi käyttää gradienttiajossa.[1]

## 4.2 Kaasukromatografia

Kaasukromatografiaa (GC eli *gas chromatography*) käytetään hajoamatta höyrystyvien yhdisteiden analysoimiseen. Siinä yhdisteiden erottuminen perustuu niiden erilaiseen jakautumiseen liikkuvaan faasiin ja stationäärifaasiin. Stationäärifaasina on usein kiinteän faasin päällä oleva haihtumaton neste ja liikkuvana faasina on inertti kaasu, esimerkiksi vety tai helium. Yhdisteet eluoituvat usein kiehumisjärjestyksessä, mutta stationäärifaasin ominaisuudet saattavat muuttaa eluotumisjärjestystä.[1,2,6,7]

Kaasukromatografia-laitteistoon kuuluu injektor, kolonni ja detektori. Kuvassa 3 on kaaviokuva kaasukromatografia-laitteistosta.



Kuva 3. Kaaviokuva kromatografilaitteistosta.[10]

Analysoitava näyte syötetään kuumaan injektoriin, jossa se höyrystyy. Kolonniin näyte siirtyy kantajakaasun mukana. Kolonni on kolonniuunissa, jonka lämpötilaa muuttamalla ajon aikana, saadaan kontrolloitua näytteessä olevien yhdisteiden jakaantumista stationäärifaasin ja liikkuvan faasin välillä. Kolonnin jälkeen yhdisteet saapuvat detektorille, joka havaitsee ne.[1]

#### 4.2.1 Liekki-ionisaatiodektektori

Liekki-ionisaatiodektektori (FID eli flame ionization detector) on kaasukromatografiassa käytetty yleisdektektori. Tutkittavat yhdisteet muodostavat sähköisesti varattuja hiukkasia palaessaan hapekkaassa vetyliekissä. Dektektori havaitsee muodostuneet varautuneet hiukkaset. Herkkyys pienenee, kun molekyylissä on happi-, fosfori-, typpi-, rikki-, tai halogeeniatomeja ja se ei havaitse vettä, jalokaasuja eikä hiilidioksidia.[1,6]

#### 4.2.2 Menetelmiä orgaanisten happojen analysoimiseksi

Näytteenkäsittely riippuu näytteestä. Yksinkertaisille/puhtaille näytteille riittää liuotus dikloorimetaaniin.

Happojen määrittämiseen löydettiin kirjallisuudesta kolme GC ajo-ohjelmaa. Jokaisessa menetelmässä dektektorina toimii FID. Kaksi menetelmää on polaarittomalla kolonnilla ja yksi on polaarisella kolonnilla. Kantajakaasuna toimii vety tai helium. Ensimmäisen parametrit ovat taulukossa 2.

Taulukko 2. GC parametrit polaarittomalla kolonnilla[25]

Ajoparametri	
kolonni	Agilent J&W DB-624UI,30 m x 0,32 mm, 1.8 µm
Split suhde	1:200
Uuniohjelma	70 C° (1 min) - 20 C°/min -> 260 C°
Injektorin lämpötila	250 C°
Dektektorin lämpötila	260 C°
Kantajakaasu	Vety
Kaasun virtausnopeus	4,0 ml/min
Injektio-tilavuus	1 µl

Menetelmää on käytetty etikka-, muurahais-, propioni- ja voi-hapon määrittämiseen.

Toisen ajo-ohjelman parametrit ovat taulukossa 3.

Taulukko 3. GC ajoparametrit polaarittomalla kolonnilla[24]

Ajoparametri	
Kolonne	Supelco DB 1 (30 m x 0,25 mm)
Split suhde	10:1
Uuniohjelma	100 -> 150 C° 5 C°/min – 150 -> 280 C° 3 C°/min
Injektorin lämpötila	100 C°
Detektorin lämpötila	280 C°
Kantajakaasu	Helium
Virtausnopeus	20 ml/min, kolonnissa (60 °C:ssa)1,5 ml/min
Injektio-tilavuus	1 µl

Menetelmää on käytetty fumaari-, meripihka-, oksaali-, omena-, sitruuna- ja viinihapon määrittämiseen.

Kolmannessa ajo-ohjelmassa lämpötilat ovat korkeimmat, joten se sopii hankalimmissa näytteissä olevien happojen analysoimiseen. Sitä on käytetty puuhydrolysaatin analysoimiseen. Ajoparametrit ovat taulukossa 4.

Taulukko 4. GC ajoparametrit polaarisella kolonnilla[26]

Ajoparametri	
Kolonne	CP WAX 52 CB; 60M x 0,23 mm ID x 0,25 µm
Split suhde	splitless
Uuniohjelma	35 C° (2 min) - 6 C°/min -> 100 C° - 15 C°/min -> 250 C° (10 min)
Injektorin lämpötila	300 C°
Detektorin lämpötila	300 C°
Kantajakaasu	Helium
Kaasun virtausnopeus	2,0 ml/min, kolonnissa 1 ml/min
Injektio-tilavuus	0,4 µl

Menetelmää on käytetty etikka- ja muurahaishapon määrittämisessä.

## 5 Validointi

Validoinnilla varmistetaan, että menetelmä sopii käyttötarkoitukseen. [4] Validointisuureina tutkittiin lineaarisuutta, toteamis- ja määrittysrajaa, spesifisyyttä ja selektiivisyyttä, täsmällisyyttä, tarkkuutta, herkkyyttä ja mittausepävarmuutta.

Validoinnissa käytettävä reagenssit olivat analyysipuhtaita. Näytteenkäsittelynä oli vain näytteen laimennus veteen ja suodatus 0,45 µm membraanisuodattimella.

### 5.1 Optimointi

Alustavina ajoparametreina käytettiin jo käytössä olevaa muutaman hapon määrittämisessä käytettävää menetelmää. Menetelmän kehitys aloitettiin määrittämällä happojen retentioajat. Hapot mitattiin ensin yksitellen, kun pitoisuus oli 1000 ppm. Sen jälkeen samalla pitoisuudella samaan aikaan, jolloin nähtiin paremmin piikkien päällekkäisyydet. Resoluutiota parannettiin muuttamalla kolonniuunin lämpötilaa ja eluentin, rikkihapon vahvuutta.

### 5.2 Toteamis- ja määrittysraja

Toteamisraja (LOD, limit of detection) on pienin analyysimenetelmällä havaittava pitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti tutkittavalle yhdisteelle. Toteamisraja lasketaan kaavalla 1. [4,11,12]

$$\text{LOD} = \mu_B + 3S \quad (1)$$

$\mu_B$  = nollanäytteen tulosten keskiarvo

S = nollanäytteen tulosten keskihajonta



Määritysraja (LOQ, limit of quantitation) on pienin analysoitavan analyytin pitoisuus, joka voidaan määrittää luotettavalla tarkkuudella ja täsmällisyydellä. Määritysraja lasketaan kaavan 2 avulla.[4,11,12]

$$LOQ = \mu_B + 10S \quad (2)$$

$\mu_B$  = nollanäytteen tulosten keskiarvo

$S$  = nollanäytteen tulosten keskihajonta

Toteamis- ja määritysraja määritettiin mittaamalla viisi rinnakkaisnäytettä useana eri päivänä. Näytteenä käytettiin ultrapuhdasta vettä.

### 5.3 Lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmän mittausalueella tarkoitetaan yleensä lineaarista mittausaluetta tai analyytistä toiminta-aluetta.[4] Standardisuoran tarkastelussa käytetään apuna pienimmän neliösumman periaatteella tehtyä suoraa, jonka lineaarisuus on sitä parempi, mitä lähempänä sen selitysaste ( $R^2$ ) on arvoa 1. Lineaarisuutta tarkastellaan myös residuaalikuvaajan avulla, jossa residuaalit esitetään pitoisuuden funktiona. Residuaalit ovat mitattujen arvojen ja kuvaajalta saatujen arvojen erotuksia. Lineaarisella mittausalueella residuaalit ovat jakautuneet tasaisesti nollatason molemmin puolin.[4,5,12]

Lineaarisuus määritettiin mittaamalla 9 eri pitoisuuksista standardiliuosta jokaisella määritettävällä hapolla pitoisuusalueella 10 – 10000 ppm. Fumaarihapolle tehtiin standardiliukset vain välillä 10 – 5000 ppm, koska sen liukenevuus veteen on muita happoja pienempi. Standardit mitattiin kolmena eri päivänä kahdella rinnakkaismäärityksellä

#### 5.4 Spesifisyys ja selektiivisyys

Menetelmä on spesifinen, jos se antaa vasteen ainoastaan tutkittavalle yhdisteelle. Jos menetelmä antaa vasteen usealle yhdisteelle, mutta erottaa tutkittavan yhdisteen vasteen muiden näytematriisissa olevien yhdisteiden vasteista, se on selektiivinen. [4,12]

Menetelmän spesifisyyden ja selektiivisyyden määrittämisessä verrataan tavallista standardisuoraan näytematriisiin valmistettuun standardisuoraan. Kun regressiosovituksen kulmakertoimet ovat samat ( $\pm 5\%$ ), voidaan olettaa, että ero syntyy matriisin alkuperäisestä analyyttipitoisuudesta. Matriisi ei silloin aiheuta häiriötä eri pitoisuustasoilla. [5]

Spesifisyys ja selektiivisyys määritettiin mittaamalla kerran kahdeksan näytteeseen valmistettua standardia. Standardien pitoisuusalue oli 10 - 5000 ppm.

#### 5.5 Täsmällisyys

Täsmällisyys kertoo toisistaan riippumattomien tulosten vastaavuudesta ja satunnaisvirheestä. [4,13] Täsmällisyys määritettiin MUKit-ohjelmalla.

Täsmällisyyttä tutkittiin toistotarkkuuskokeilla mittaamalla useana päivänä kontrollinäytteitä. Ne olivat itse valmistettuja happostandardeja, joiden pitoisuus oli 1000 ppm. Lisäksi mitattiin näytteitä kahdella eri pitoisuudella kahtena rinnakkaisnäytteenä useana päivänä. Näytteet olivat laimentamattomia ja 10 x laimennettuja.

## 5.6 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuus kuvaa mittaustuloksen ja oikean arvon lähekkäisyyttä. Se kertoo menetelmän satunnaisvirheen ja systemaattisen virheen. Tarkkuus määritetään MUKit-ohjelmalla saantokokeiden tuloksista, jotka lasketaan kaavan 3 mukaisesti.

Saantokokeet tehtiin kahteen eri pitoiseen näytteeseen kahdella eri pitoisella lisäyksellä. Näytteinä käytettiin laimentamatonta ja 10 laimennettua näytettä. Lisätyt pitoisuudet olivat 500 ppm ja 1000 ppm. Saantokokeet laskettiin kaavan 3 mukaisesti.[4,5]

$$R\% = \frac{S-U}{C} * 100 \% \quad (3)$$

R = saanto- %

C = lisätty pitoisuus (tunnettu)

S = näytteen alkuperäinen pitoisuus (mitattu)

U = lisäyksen sisältävän näytteen pitoisuus (mitattu)

## 5.7 Herkkyys

Herkkydessä katsotaan, kuinka hyvin menetelmä havaitsee näytepitoisuuksien pienet vaihtelut. Herkkyys määritetään pienimmän neliösumman menetelmällä saadun lineaarisen mittausalueen kulmakertoimen arvosta.[4,5,11]

## 5.8 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuudella katsotaan valitulla todennäköisyydellä todellisen arvon olevan tiettyjen raja-arvojen välillä.[4,5,11] Mittausepävarmuus määritettiin MUKit-ohjelmalla.

Sen määrittämiseksi analysoitiin kontrollinäytteitä, rutiininäytteitä rinnakkaisnäytteineen ja saantokokeita, mitä analysoitiin täsmällisyyden ja tarkkuuden määrittämiseksi.

MUkit (*Measurement Uncertainty Kit*) on tietokoneohjelma mittausepävarmuuden arviointiin. Se on tarkoitettu laboratoriokäyttöön ja sen laskenta perustuu Nordtest TR 537 – raporttiin.[16]

## 6 Tulokset

Tuloksissa ei ole otettu huomioon selvästi poikkeavia arvoja.

### 6.1 Optimointi

Laitteen optimoinnin jälkeen saadut ajoparametrit ovat taulukossa 5.

Taulukko 5. Happojen määityksessä käytetty laitteisto ja ajoparametrit.

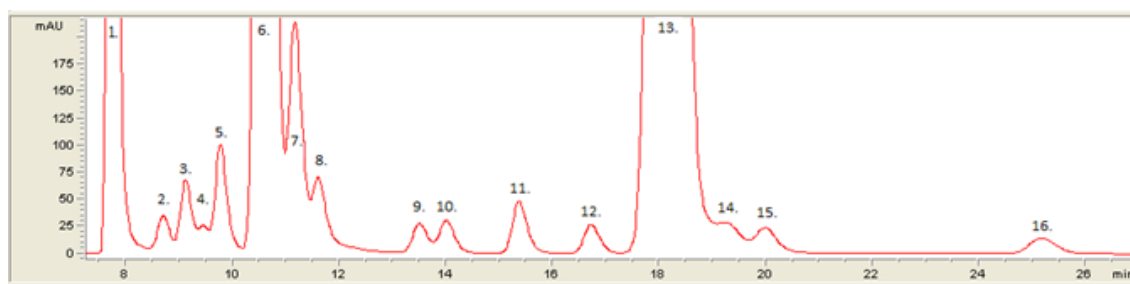
<b>Analyysilaitteisto</b>	HPLC Hewlet Packard Series 1100
<b>Kolonne</b>	MetaCarb 87H 300 x 7,8mm
<b>Detektorit</b>	UV 210 nm ja RI
<b>Injektio-tilavuus, µl</b>	10
<b>Virtausnopeus, ml/min</b>	0,6
<b>Kolonninlämpötila, °C</b>	35
<b>RI detektorin lämpötila, °C</b>	35
<b>Eluentti</b>	15 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Ajoaika, min</b>	60

Määritettävien happojen retentioajat ovat eluotumisjärjestyksessä taulukossa 6.

Taulukko 6. Happojen retentioajat eluotumisjärjestyksessä

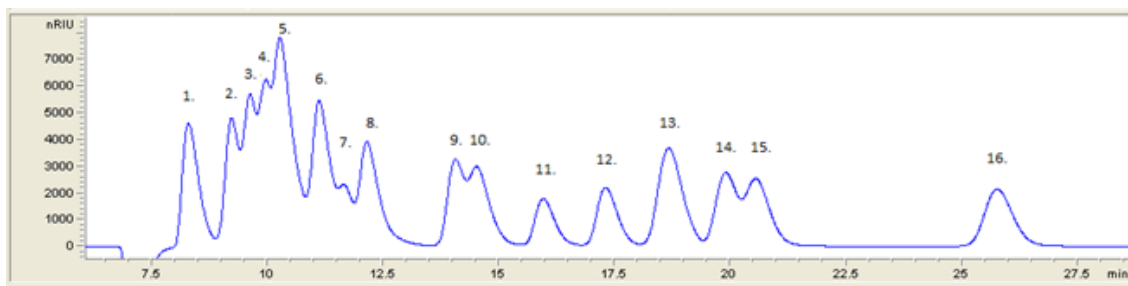
	Happo	UV (min)	RI (min)
1.	Oksaalihappo	7,7	8,3
2.	Glukuronihappo	8,7	9,2
3.	Sitruunahappo	9,1	9,6
4.	Galakturonihappo	9,5	10,0
5.	Viinihappo	9,8	10,3
6.	Maleiinihappo	10,8	11,3
6.	Omenahappo	10,8	11,3
7.	Askorbiinihappo	11,2	11,7
8.	Malonihappo	11,6	12,2
9.	Meripihkahappo	13,5	14,1
10.	Maitohappo	14,0	14,6
11.	Muurahaishappo	15,4	16,0
12.	Etikkahappo	16,8	17,4
13.	Fumaarihappo	18,0	18,6
14.	Levuliinihappo	19,3	19,9
15.	Propionihappo	20,0	20,6
16.	Voihappo	25,1	25,7

Kuvassa 4 on kromatogrammi UV-detektorilla happojen retentoitumisesta.



Kuva 4. Happojen retentoituminen UV-detektorilla (210 nm), kun kolonninlämpötila 35 °C ja virtausnopeus oli 0,6 ml/min ja eluentina käytettiin 15 mM rikkihappoa.

Happojen retentoituminen RI-detektorilla näkyy kromatogrammissa kuvassa 5.



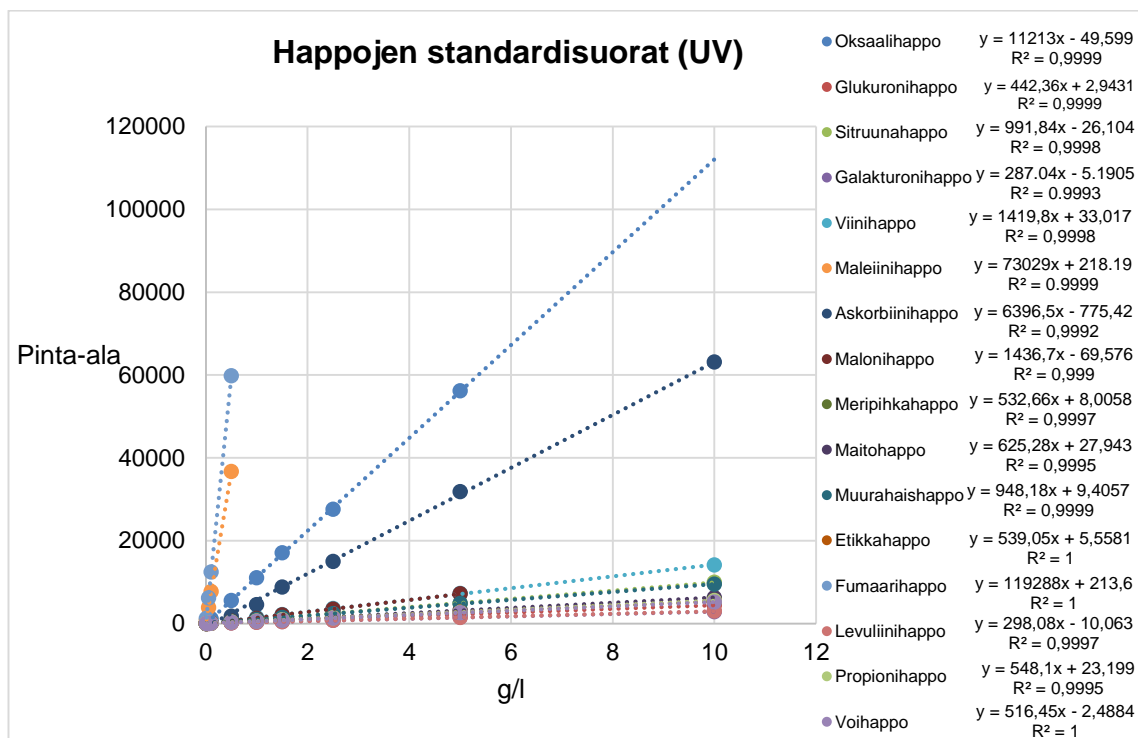
Kuva 5. Happojen retentoituminen RI-detektorilla, kun kolonninlämpötila 35 °C ja virtausnopeus oli 0,6 ml/min ja eluentina käytettiin 15 mM rikkihappoa.

## 6.2 Toteamis- ja määritysraja

Toteamis- ja määritysrajat UV ja RI detektorille laskettiin kaavojen 1 ja 2 avulla nollanäytteiden mittaustuloksista. Menetelmän toteamisrajaksi saatiin UV detektorilla 0,7 ppm ja määritysrajaksi 2,3 ppm. RI-detektorilla toteamisraja oli 0,8 ppm ja määritysraja oli 2,5 ppm.

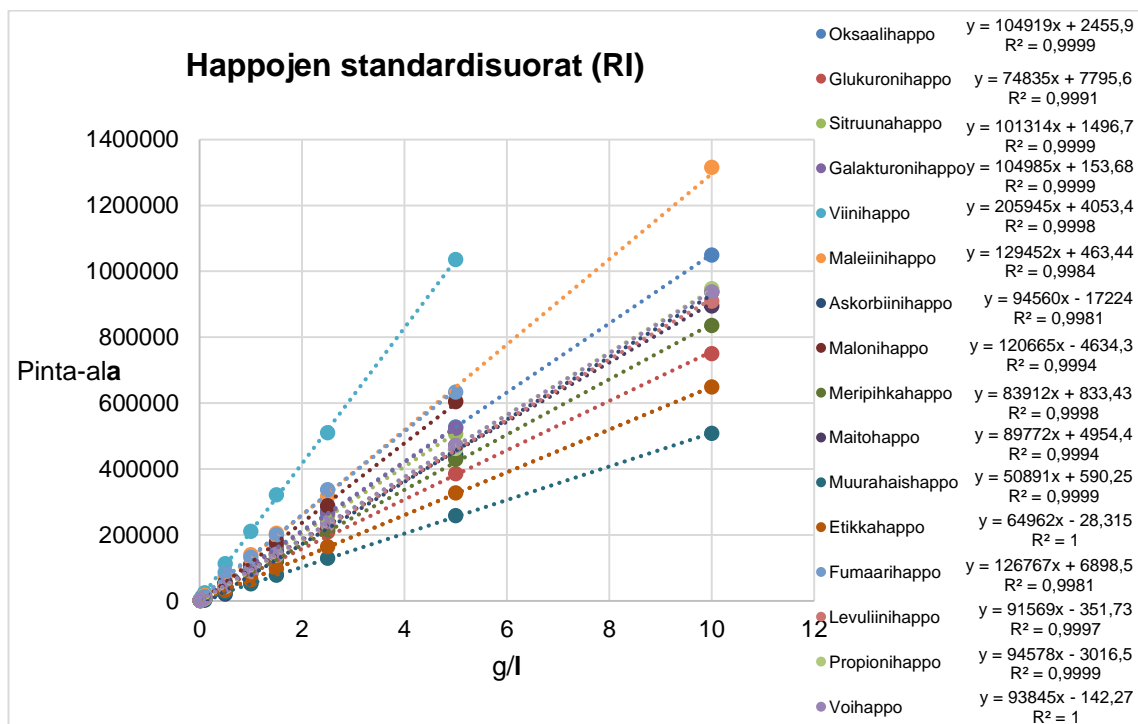
## 6.3 Lineaarinen mittausalue

Kunkin hapon piikkien pinta-aloista laskettiin keskiarvo ja muodostettiin kuvaaja pinta-ala hapon pitoisuuden funktiona. UV-detektorilla saadut kuvaajat ovat kuvassa 6.



Kuva 6. Happojen standardisuorat UV-detektorilla

RI-detektorilla mitattujen happojen standardisuurien kuvaajat ovat kuvassa 7.



Kuva 7. Happojen standardisuorat RI-detektorilla

Happojen lineaariset mittausalueet UV- ja RI-detektorilla residuaalien avulla on koottu taulukkoon 7. Residuaalit ovat liitteessä 1.



Taulukko 7. Happojen lineaarinen mittausalue

Happo	Lineaarisuus, UV (ppm)	Lineaarisuus, RI (ppm)
Oksaalihappo	10–5000	10–10 000
Glukuronihappo	10–10 000	10–10 000
Sitruunahappo	10–10 000	10–5000
Galakturonihappo	10–10 000	10–5000
Viinihappo	10–10 000	10–5000
Maleiinihappo	10–500	10–10 000
Askorbiinihappo	10–10 000	100–10 000
Malonihappo	10–5000	10–5000
Meripihkahappo	10–10 000	10–10 000
Maitohappo	10–10 000	10–10 000
Muurahaishappo	10–10 000	10–10 000
Etikkahappo	10–10 000	10–10 000
Fumaarihappo	10–500	10–5000
Levuliinihappo	10–10 000	10–10 000
Propionihappo	10–10 000	10–10 000
Voihappo	10–10 000	10–10 000

Menetelmä on lineaarinen lähes kaikilla hapoilla molemmilla detektoreilla 9 pisteen kalibrointisuoralla pitoisuusalueella 10 – 10000 ppm. Suurimmat poikkeukset tekevät fumaari-, askorbiini- ja maleiinihappo.

#### 6.4 Spesifisyys ja selektiivisyys

Detektorien antamista vasteista muodostettiin hapoille kuvaajat pinta-ala pitoisuuden funktiona. Standardisuorat ovat kuvioissa 6 ja 7. Standardinlisäyssuoran kuvaajat ovat liitteessä 2. Standardisuorien kulmakertoimista laskettiin niiden prosentuaaliset erot, jotka ovat taulukossa 8.

Taulukko 8. Ulkoisten standardisuurien ja standardinlisäyssuurien kulmakertoimien erot.

Happo	Puuhydrolysaatti		Muunneltu puuhydrolysaatti		Tuntematon	
	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)
Oksaalihappo	-14	13	-13	16	-12	19
Glukuronihappo	17	14	16	13	15	11
Sitruunahappo	9	6	11	9	12	10
Galakturonihappo	18	10	18	11	22	11
Viinihappo	5	-1	9	1	11	4
Maleiinihappo	1	-90	0	5	7	12
Askorbiinihappo	9	7	13	9	2	-10
Malonihappo	12	9	17	15	19	19
Meripihkahappo	2	3	2	4	1	2
Maitohappo	1	2	2	3	0	4
Muurahaishappo	2	6	2	6	-31	6
Etikkahappo	3	4	3	4	5	7
Fumaarihappo	1	3	12	5	2	7
Levuliinihappo	250	9	250	2	240	3
Propionihappo	-1	-1	4	9	3	3
Voihappo	0	0	1	0	2	2

Alle 5 % standardisuurien erot on merkitty taulukkoon vihreällä. Menetelmä on erittäin selektiivinen molemmilla detektoreilla meripihka-, maito- ja voihappoa analysoitaessa, standardisuurien ero oli alle 5 %. Menetelmä on selektiivinen levuliinihappoa analysoitaessa vain RI-detektorilla. UV-detektorilla näytematriisi häiritsee analysointia erittäin paljon, ero oli yli 200 %. Oksaali-, glukuroni-, galakturoni- ja malonihapolla standardsuurien ero oli molemmilla detektoreilla yli 10 %:n.

## 6.5 Täsmällisyys

Kontrollinäytteiden- ja oikeiden näytteiden toistomittauksista saadut tulokset syötettiin MUKit – ohjelmaan, joka laski mittaustulosten satunnaisvirheet. MUKit – ohjelman antamat tulokset ovat taulukossa 9.

Taulukko 9. MUKit-ohjelman antamat tulokset menetelmän täsmällisyydelle

Happo	Puuhydrolysaatti		Muunneltu puuhydrolysaatti		Tuntematon	
	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)
Oksaalihappo	0,1	1,6	0,1	1,6	0,1	1,6
Glukuronihappo	0,6	1,4	0,5	1,6	0,6	1,4
Sitruunahappo	1,1	1,9	1,1	1,9	1,1	1,9
Galakturonihappo	1,5	3,5	1,5	3,5	1,5	3,5
Viinihappo	1,0	2,8	9,2	1,4	1,0	2,6
Maleiinihappo	5,5	3,6	8,4	5,0	2,2	3,6
Askorbiinihappo	18,3	9,2	20,7	9,2	14,6	9,2
Malonihappo	6,9	2,7	8,5	7,2	2,1	0,7
Meripihkahappo	4,9	4,7	15,2	3,6	1,6	2,5
Maitohappo	8,3	7,3	8,3	5,6	8,5	7,8
Muurahaishappo	1,9	2,1	2,7	1,9	3,4	4,1
Etikkahappo	2,1	2,7	1,6	2,8	2,5	2,6
Fumaarihappo	3,6	0,7	5,8	0,7	1,5	0,7
Levuliinihappo	4,1	3,0	4,7	4,6	3,4	3,0
Propionihappo	13,7	1,6	15,8	1,6	14,8	4,0
Voihappo	1,1	0,7	3,5	0,7	7,4	1,8

MUKit-ohjelma laski täsmällisyyden seuraavan kaavan mukaisesti:

$$u(R_w)(\%) = \sqrt{\text{kontrollinäytteiden keskihajonta}^2 + \text{oikeiden näytteiden keskihajonta}^2}$$

Menetelmä on erittäin täsmällinen, sillä sitä kuvaava mittaustulosten keskihajonta on pieni suurimmaksi osaksi alle 5 %:n. Suurimman poikkeuksen tekevät askorbiini- ja propionihappo UV-detektorilla. Niillä suhteellinen keskihajonta oli yli 10 %.

## 6.6 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuus määritettiin MUKit-ohjelmalla saantokokeiden tuloksista, jotka laskettiin kaavalla 3. Saantokokeiden tulosten keskiarvot ovat liitteessä 3. MUKit -ohjelman antamat tulokset on koottu taulukkoon 10.

Taulukko 10. Menetelmän tarkkuudelle määritetyt systemaattiset virheet

Happo	Puuhydrolysaatti		Muunneltu puuhydrolysaatti		Tuntematon	
	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)
Oksaalihappo	5	12	6	10	7	9
Glukuronihappo	25	26	23	28	17	17
Sitruunahappo	13	13	11	14	8	5
Galakturonihappo	18	94	11	8	10	4
Viinihappo	19	32	12	27	9	6
Maleiinihappo	19	12	44	45	39	8
Askorbiinihappo	43	34	28	33	21	35
Malonihappo	15	31	8	13	5	4
Meripihkahappo	19	11	6	11	5	4
Maitohappo	16	14	12	15	4	4
Muurahaishappo	10	18	18	14	3	4
Etikkahappo	9	10	8	11	4	5
Fumaarihappo	65	6	54	6	58	5
Levuliinihappo	28	8	120	6	207	3
Propionihappo	13	5	23	6	12	4
Voihappo	4	3	4	4	3	3

MUKit-ohjelma laski tarkkuuden seuraavien kaavojen mukaisesti:

$$u(C_{saanto}) = \sqrt{\text{standardiliuoksen epävarmuus}^2 + \text{pipetointiepävarmuus}^2}$$

$$RMS_{bias} (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (100\% - saanto)^2}{N}}$$

$$u(bias) (\%) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(C_{saanto})^2}$$

Menetelmä on tarkka molemmilla detektoreilla mitattaessa ainoastaan voihippaa määritettäessä, sillä systemaattinen virhe on alle 4 %:n. Muilla hapoilla arvot on välillä 2,9 – 120,2 %. Tuntemattomalla näytteellä tarkkuus on parempi kuin puuhydrolysaateilla. Tuntemattomalla näytteellä systemaattinen virhe on molemmilla detektoreilla pääasiassa lähellä 5 %:a.

## 6.7 Herkkyys

Menetelmän herkkyys saatiin selville standardisuurien kulmakertoimesta. Standardisuurat ovat kuviossa 6 ja 7. Menetelmän herkkyudet UV- ja RI-detektorilla on merkitty taulukkoon 11.

Taulukko 11. Menetelmän herkkyudet UV- ja RI-detektorilla

Happo	UV (1/ppm)	RI (1/ppm)
Oksaalihappo	11,2	105,0
Glukuronihappo	0,4	75,0
Sitruunahappo	1,0	101,0
Galakturonihappo	0,3	105,0
Viinihappo	1,4	206,0
Maleiinihappo	73,0	130,0
Askorbiinihappo	6,4	96,0
Malonihappo	1,4	121,0
Meripihkahappo	0,5	84,0
Maitohappo	0,6	90,0
Muurahaishappo	1,0	51,0
Etikkahappo	0,5	65,0
Fumaarihappo	120,0	128,0
Levuliinihappo	0,3	92,0
Propionihappo	0,6	95,0
Voihappo	0,5	94,0

UV-detektorilla herkkyys oli lähes kaikilla hapoilla alle 1 1/ppm. Suurimman poikkeuksen teki fumaarihappo, jonka herkkyys oli 120 1/ppm. RI-detektorilla herkkyys vaihteli eri hapoilla 50 - 210 1/ppm välillä.

## 6.8 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus määritettiin MUKit-ohjelmalla täsmällisyys- ja tarkkuustulosten avulla. Ohjelmalla saadut tulokset ovat taulukossa 12.

Taulukko 12. Mittausepävarmuus 95 %:n luottamustasolla

Happo	Puuhydrolysaatti		Muunneltu puuhydrolysaatti		Tuntematon	
	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)	UV (%)	RI (%)
Oksaalihappo	11	24	12	21	14	19
Glukuronihappo	51	52	46	56	35	35
Sitruunahappo	27	26	23	29	17	12
Galakturonihappo	36	190	23	17	21	12
Viinihappo	38	64	31	54	18	13
Maleiinihappo	41	25	90	90	79	19
Askorbiinihappo	94	71	69	69	51	72
Malonihappo	34	63	23	30	11	8
Meripihkahappo	39	24	33	23	10	9
Maitohappo	37	33	30	32	19	18
Muurahaishappo	21	36	36	29	9	12
Etikkahappo	19	21	17	22	9	11
Fumaarihappo	130	13	110	12	120	11
Levuliinihappo	57	18	240	16	410	9
Propionihappo	38	12	56	12	39	11
Voihappo	8	7	11	8	16	7

Mittausepävarmuus oli UV-detektorilla välillä 8 – 415 % ja RI-detektorilla 7 – 201 %. Pienin mittausepävarmuus saatiin voihapolle molemmilla detektorilla. Huonoimmat mittausepävarmuudet tulivat askorbiini-, glukuroni- ja maleiinihapolle.

## 7 Päätelmät

Alussa määritettäviä happoja oli 17. Omenahappo jätettiin kuitenkin pois, koska se eluoi-  
tui maleiinihapon kanssa samaan aikaan. Tämä pitää huomioida maleiinihappoa määrit-  
täessä.

Ajoaika riippuu tutkittavasta näytteestä. Validoinnissa käytetyillä näytteillä ajon vähim-  
mäisaika oli 60 minuuttia. Happojen standardisuoria ajettaessa analyysiaika oli 30 mi-  
nuuttia, sillä viimeisenä eluoituvan voihapon retentioaika oli noin 25 minuuttia.

Laskennalliset toteamis- ja määrittäysrajat olivat pieniä. Käytännössä lineaarisen mitta-alueen pienintä pitoisuutta, 10 ppm, voidaan pitää toteamis- ja määrittäysrajana.

Fumaari- ja maleiinihapon pitoisuuden noustessa yli 500 ppm UV-detektori ei pystynyt luotettavasti mittaamaan, jolloin pisteet alkoivat muodostaa käyrää. Askorbiinihappo oli lineaarinen RI-detektorilla välillä 100 -10000 ppm. Muilla hapoilla lineaarinen mitta-alue alkoi 10 ppm:stä. Askorbiinihapolla se alkaa vasta 100 ppm:ssä, koska askorbiinihappo muodosti pienen piikin, jota ei havaita pienemmillä pitoisuuksilla sen vieressä olevien suurien piikkien takia.

Täsmällisyyden tulokset olivat hyviä. Hyviin tuloksiin vaikutti se, että näytteissä ei ollut kaikkia määritettäviä happoja.

Huono tarkkuus johtuu huonoista saantoprosenteista, joihin vaikuttaa näytematriisi ja huonosta retentoitumisesta johtuva huono integrointi. Voihapolla ongelmaa ei ole havaittavissa.

Suuriin mittausepävarmuuksiin vaikutti eniten saantokokeiden huonot saantoprosentit. Siihen vaikutti myös lisätyn standardiliuoksen pitoisuuden epävarmuus sekä pipetoinnista ja integroinnista aiheutuva epävarmuus.

## 8 Yhteenveto

HPLC analyysimenetelmä happojen määrittämiseksi vaatii vielä lisää kehittämistä, jotta kaikkien 16 hapon analysoiminen olisi luotettavaa. Menetelmästä pitäisi saada tarkempi ja täsmällisempi. Lisäksi mittausepävarmuus pitäisi saada pienemmäksi. Menetelmää voidaan kuitenkin käyttää joidenkin happojen, esimerkiksi voihapon, analysoimiseen.

Piikkien päällekkäisyys aiheuttaa huonoja saantoprosentteja ja siten huonoa tarkkuutta ja mittausepävarmuutta. Parempi erottuminen parantaisi menetelmän luotettavuutta.

Tämä huomataan esimerkiksi voihapsen tuloksissa, sillä sen piikki on selvästi erillään muiden happojen piikeistä. Voihapsen integroiminen on siten luotettavaa. Retentiota voisi parantaa pidentämällä kolonnia ja lisäämällä virtausnopeutta. Samalla lämpötilaa pitäisi nostaa, jotta kolonnin paineensietokyky ei ylittyisi.

Täsmällisyyttä ja tarkkuutta voisi parantaa lisäämällä menetelmään toimiva näytteenkäsittely. Menetelmään vaikuttaa näytteissä olevat epäpuhtaudet, sillä hapoilla, joita ei näytteissä ollut, sai huonoja saantoprosentteja. Näytematriisin vaikutus huomataan myös spesifisyyden ja selektiivisyyden tuloksissa.

UV- ja RI-detektorit havaitsevat kaikki hapot validoinnissa käytetyistä näytteistä. Tuloksissa ei näy selkeästi mikäli toinen detektoreista olisi yleisesti ottaen parempi happoja analysoitaessa. Detektori pitää kuitenkin valita joillekin hapoille erikseen, esimerkiksi levuliinihapon mittaukseen sopii paremmin RI- kuin UV-detektori.

GC:lle löydettiin kirjallisuudesta kolme erilaista ajo-ohjelmaa happojen määrittämiseksi. Lähteiden mukaan menetelmillä on analysoitu vain muutamaa happoa. Useamman happon analysoiminen voi myös olla mahdollista. Näytteenkäsittely pitää valita tutkittavan näytteen mukaan.



## Lähteet

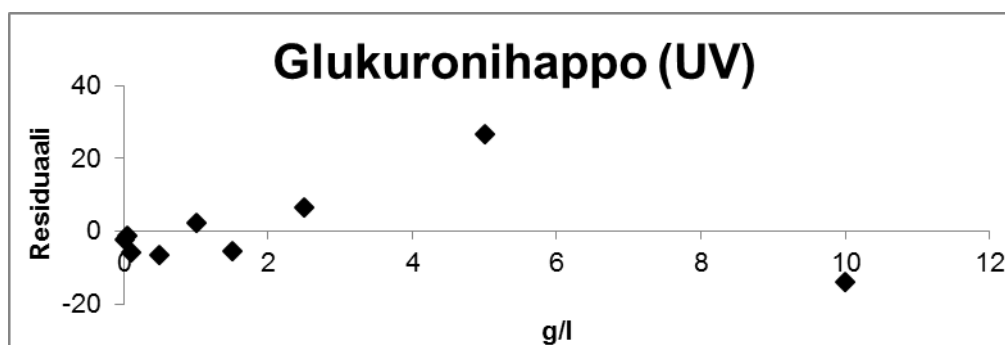
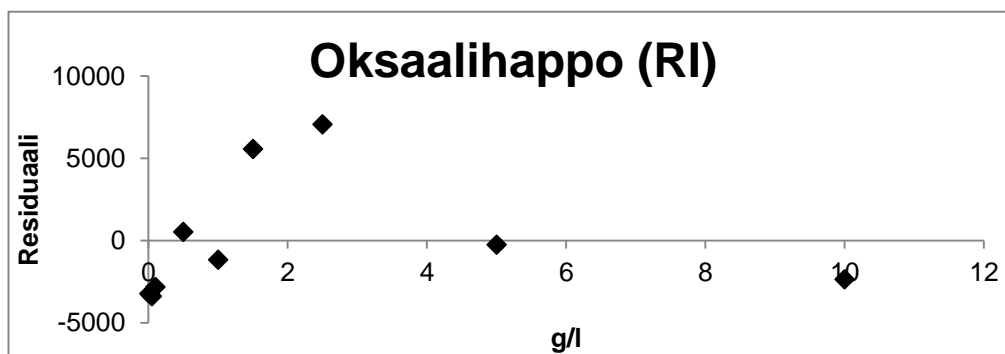
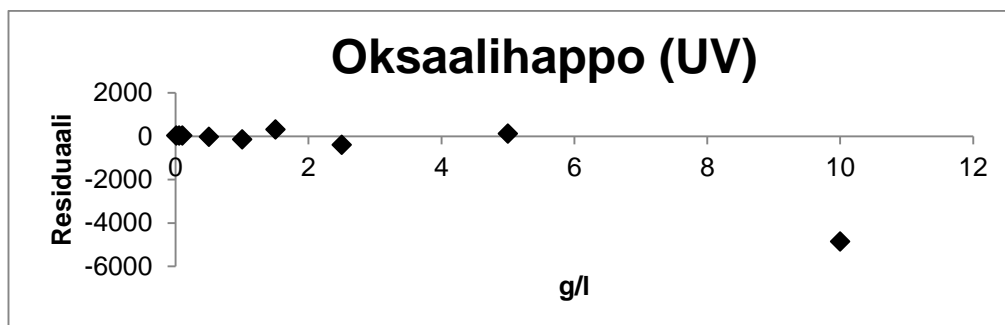
- 1 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita. 5. Painos.
- 2 Daniel C. Harris. 2002. Quantitative chemical analysis. 6. Painos. W.H. Freeman and company, New York.
- 3 Snyder, Lloyd R., Kirkland, Joseph J., Glajch, Joseph L. 1997. Practical HPLC method development. 2 painos. USA: A Wiley-Interscience Publication.
- 4 Ehder, Tapio. 2005. Kemian metrologian opas. Helsinki
- 5 Saari, Leena. 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus. Evira.
- 6 Fritz, James S. & Schenk, George H. 1987. Quantitative analytical chemistry. 5th edition. New Jersey. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- 7 Lehtonen, Pekka o. & Sihvonen, Marja-Liisa. 2004. Laboratorioalan analyttinen kemia. 1. Painos. Helsinki. Edita Prima Oy.
- 8 Engelhardt, Heinz. 1986. Practice of high performance liquid chromatography. Germany. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 9 Vickrey, Thomas M. 1983. Liquid chromatography detectors. New York. Marcel Dekker, Inc..
- 10 [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/87/Gas\\_chromatograph.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/87/Gas_chromatograph.png). Katsottu 02.08.2015.
- 11 Marjanen, Jari J. Mäkinen, Irma. Niemi, Ritva. Saares, Riitta ja Suortti, Anna-Mari. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki. Suomen ympäristökeskus.

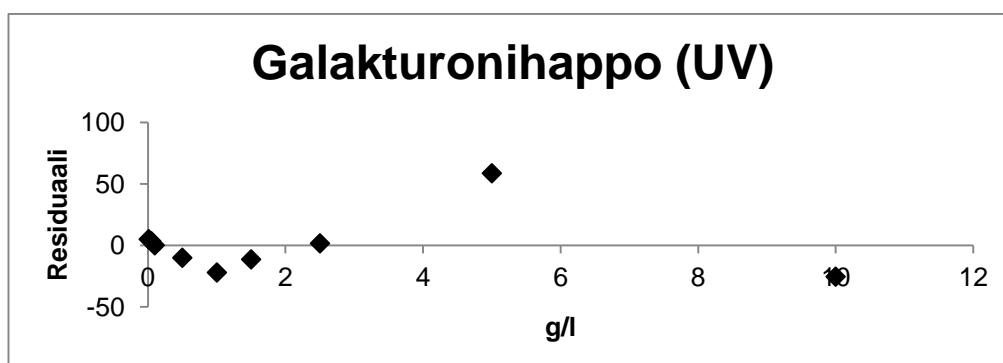
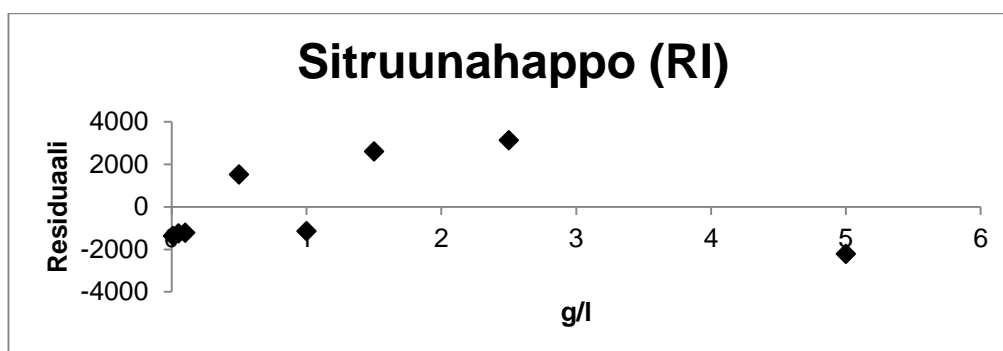
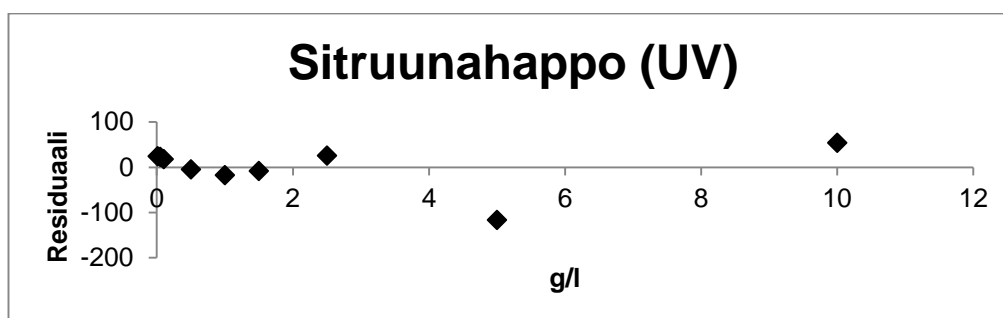
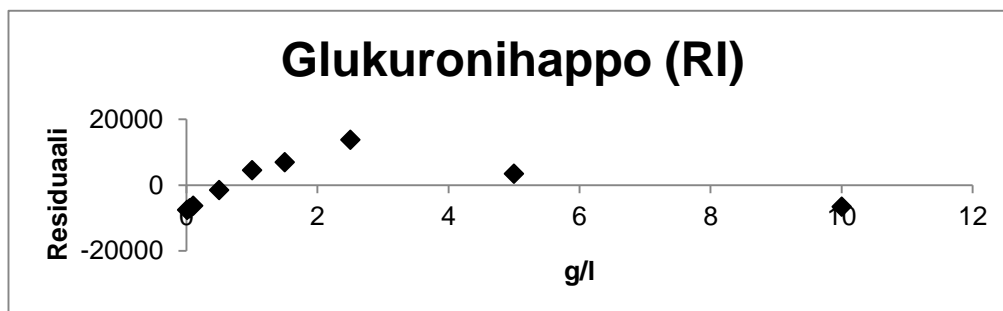
- 12 Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje, 1997. Helsinki. Elintarvikevirasto.
- 13 Leppänen, Kaisu. Puusta jalostettavat uudet tuotteet. 19.04.2012. [http://www.metla.fi/tapahtumat/2012/bio-loppuseminaari/pdf/BIO\\_19-4-2012\\_11-Leppanen.pdf](http://www.metla.fi/tapahtumat/2012/bio-loppuseminaari/pdf/BIO_19-4-2012_11-Leppanen.pdf). Katsottu 2.8.2015
- 14 <http://www.doria.fi/xmlui/bitstream/handle/10024/90679/Kandidaatinty%C3%B6.pdf?sequence=2:1.8.2015>:.....Lange, J-P. (kirj.)/Centi, G. & Van Santen R.A. (toim.). 2007. Catalysis for Renewables – From Feedstock to Energy Production. Weinheim, Saksa. WILEYVCH. 425 sivua. ISBN 978-3-527-31788-2. Katsottu 2.8.2015
- 15 Klemm D., Heublein B., Fink HP. ja Bohn A. 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. Wiley-vch. Weinheim. Saksa.vol 44. Katsottu 2.8.2015.
- 16 Mittausepävarmuusohjelmisto (MUKit). [http://www.syke.fi/fi-fi/Palvelut/Kalibrointi-palvelut\\_ja\\_sopimuslaboratorio/MUKit\\_mittausepavarmuusohjelma](http://www.syke.fi/fi-fi/Palvelut/Kalibrointi-palvelut_ja_sopimuslaboratorio/MUKit_mittausepavarmuusohjelma). Katsottu 08.05.2015.
- 17 HPLC. <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>. Katsottu 14.5.2015
- 18 Varian user guide: MetaCarb 87H organic acids column H<sup>+</sup> form.
- 19 Analyysipalvelut. <http://www.lut.fi/yhteistyö-ja-palvelut/tekniset-palvelut/analyysipalvelut>. Luettu 1.7.2015.
- 20 Lehtinen Kalle ja Turpeenoja Leena. 2008. Mooli: Reaktiot ja tasapaino. 1-2 painos. Otava. Helsinki.
- 21 Lehtinen Kalle ja Turpeenoja Leena. 2008. Mooli: Metallit ja materiaalit. 1-3 painos. Otava. Helsinki.
- 22 Kiviniemi, Ari Hiilihydraatit. [http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lu-  
kio/ke/ke1/5\\_bio-orgaaninen\\_kemia/5.2hiilihydraatit?C:D=2141386&m:sel-  
res=2141386](http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lu-<br/>kio/ke/ke1/5_bio-orgaaninen_kemia/5.2hiilihydraatit?C:D=2141386&m:sel-<br/>res=2141386). Otavan opisto. Katsottu 1.7.2015.
- 23 Puun kemiallinen rakenne.[http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/aineis-  
tot/puu/puunkemiallinenrakenne.html](http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/aineis-<br/>tot/puu/puunkemiallinenrakenne.html). Luettu 1.7.2015.

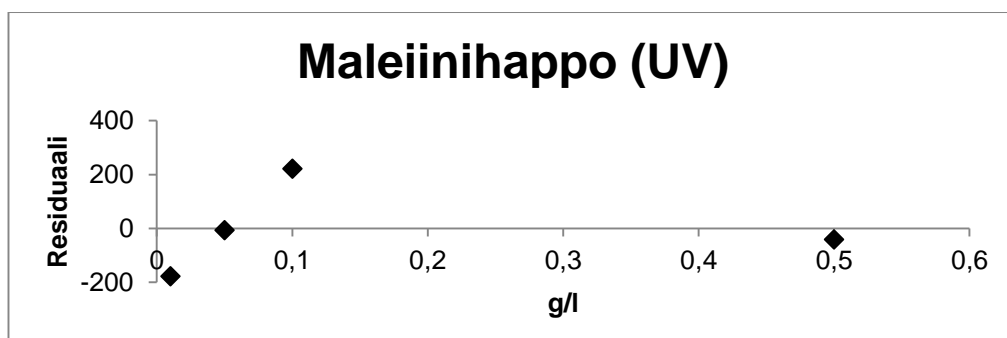
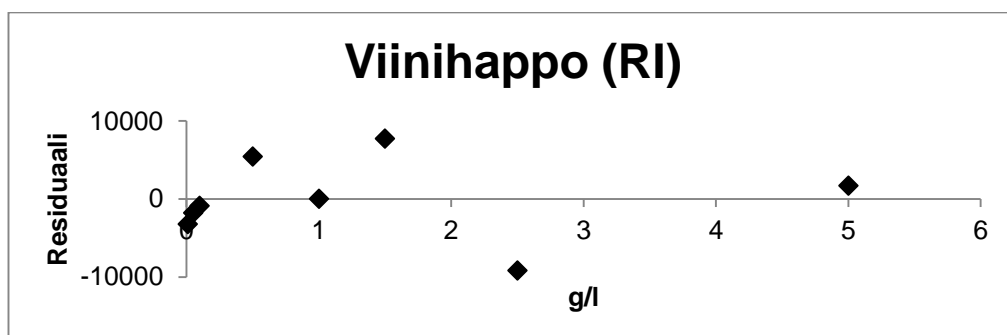
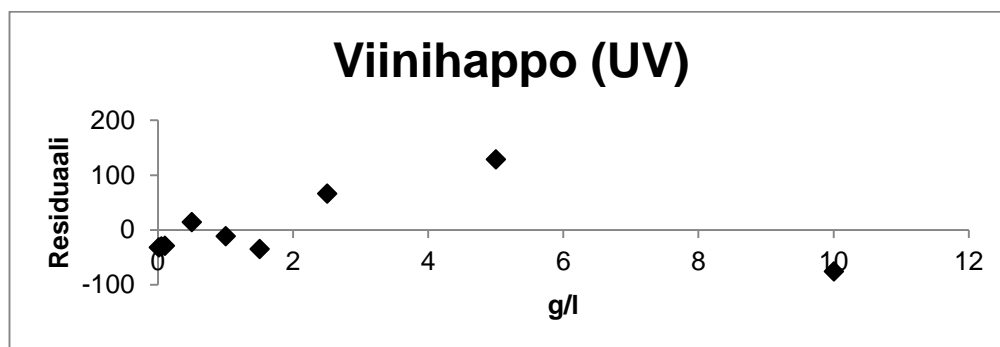
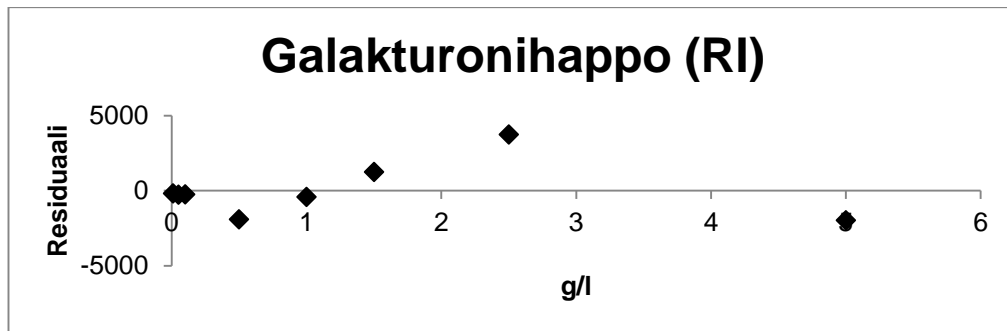
- 24 Araujo da Silva Alexsandro, Feranandes Sergio A, Garcia Fernando Cleverson & Jham Gulab N. 2002. Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. [http://www.researchgate.net/publication/233990659\\_Comparison\\_of\\_GC\\_and\\_HPLC\\_for\\_the\\_Quantification\\_of\\_Organic\\_Acids\\_in\\_Coffee](http://www.researchgate.net/publication/233990659_Comparison_of_GC_and_HPLC_for_the_Quantification_of_Organic_Acids_in_Coffee). Luettu 2.8.2015.
- 25 Lynam Ken, Oostdijk John & Vickers Allen. 2012. Trace analysis of volatile organic acids with the Agilent J&W DB-624UI GC Column. Agilent Technologies Inc. USA.
- 26 Basu B, Chattopadhyay Kalicharan, Chopra Anju, Patel M B, Singh Dheer & Tiwari A K. A systematic analytical study on lignocelluloses originated inhibitors in hydrolyzed biomass. [http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT1\(2015\)/p.81-85.pdf](http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT1(2015)/p.81-85.pdf). Luettu 2.8.2015.

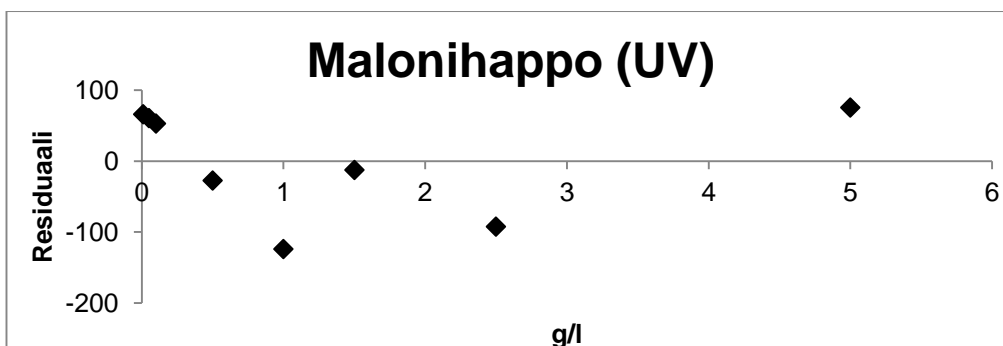
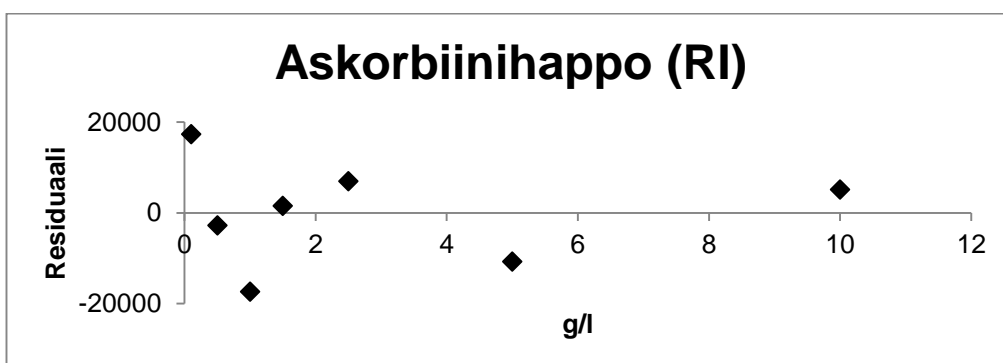
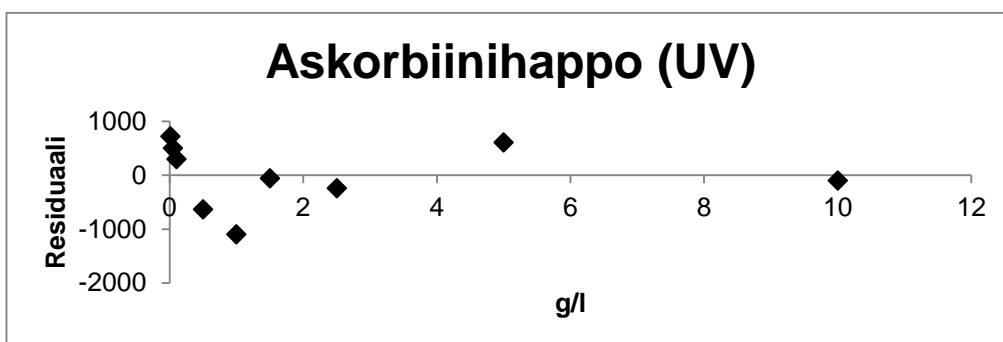
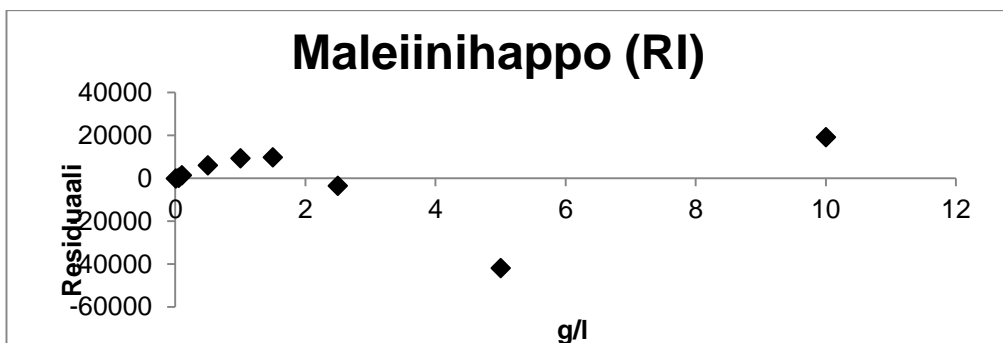
## Residuaalit

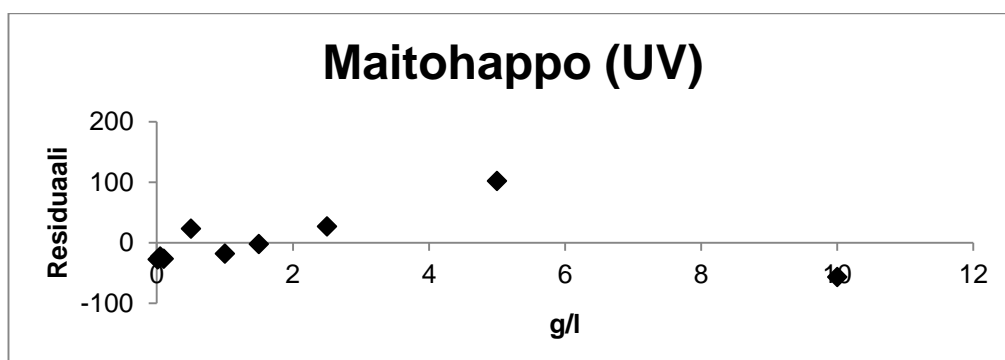
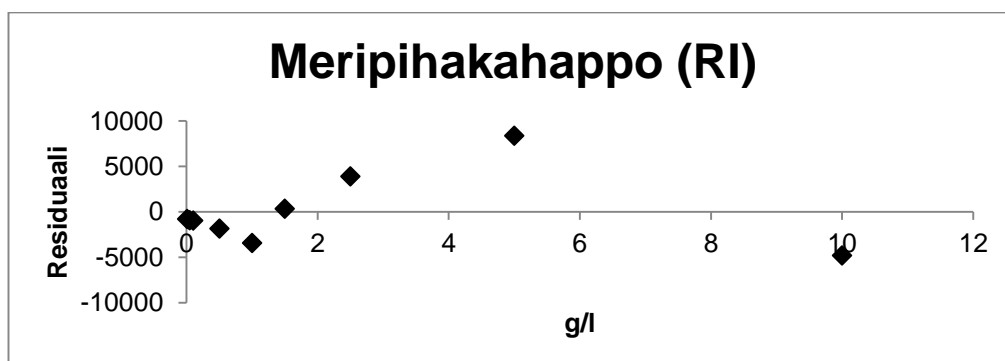
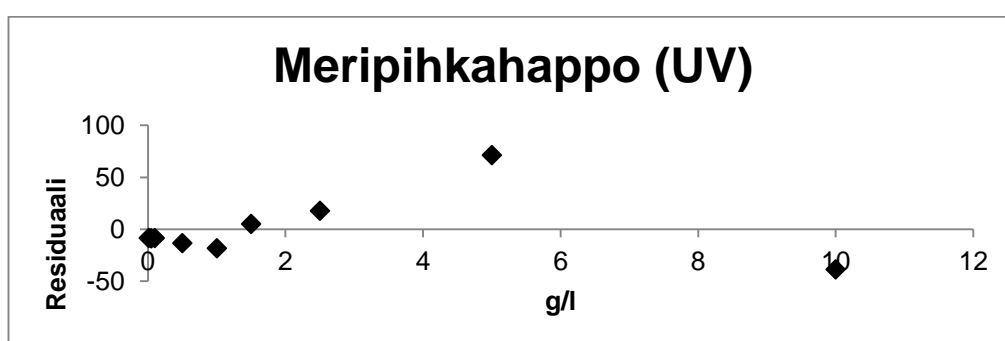
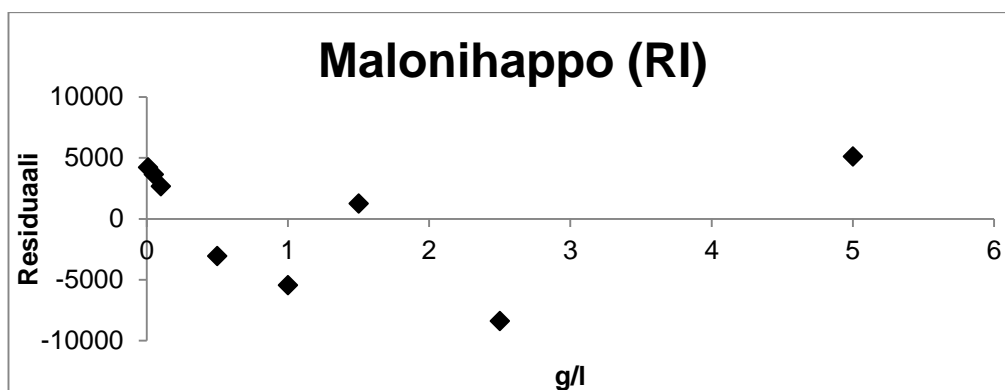
Happojen residuaalikuvaajat UV- ja RI-detektorilla mitattuna



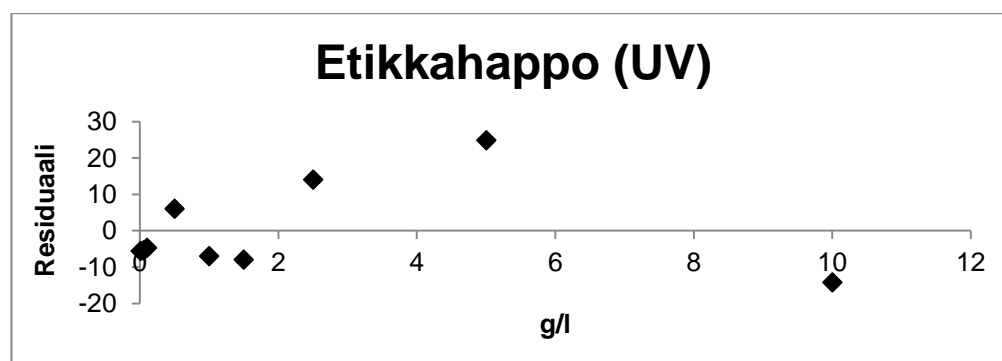
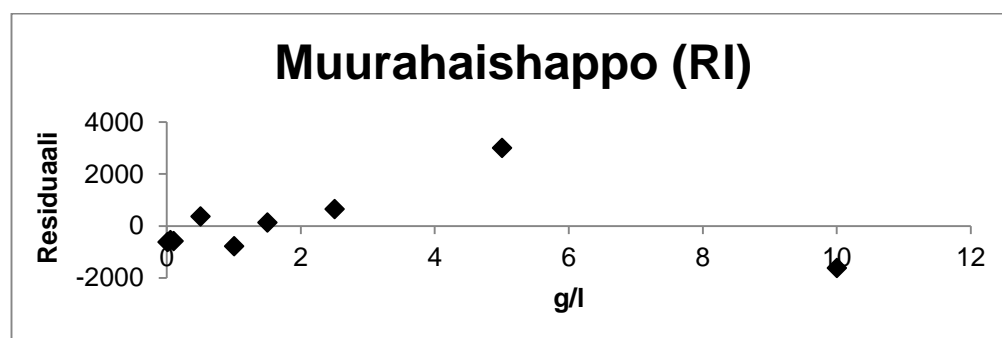
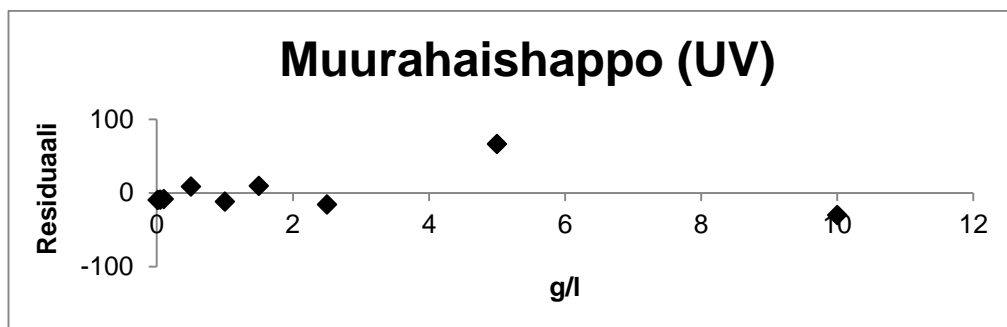
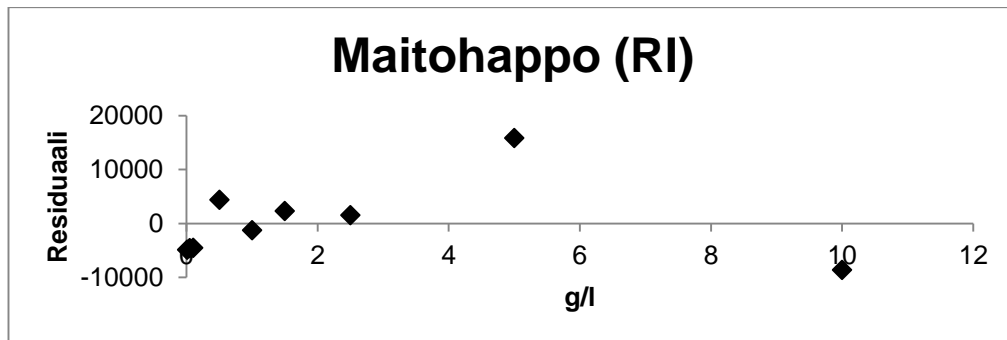


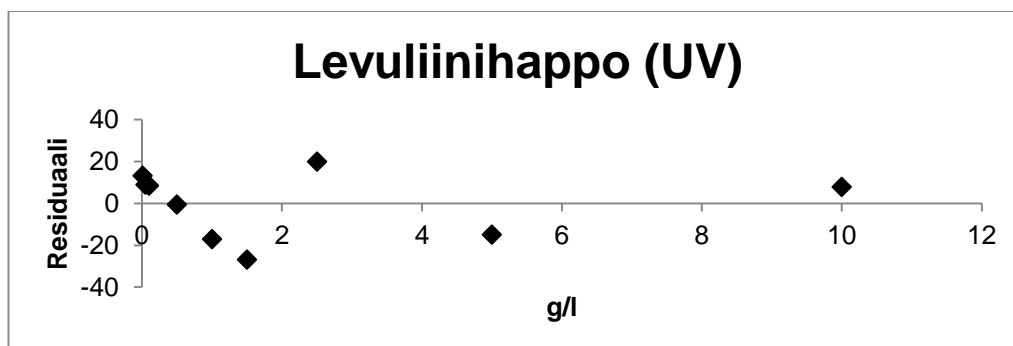
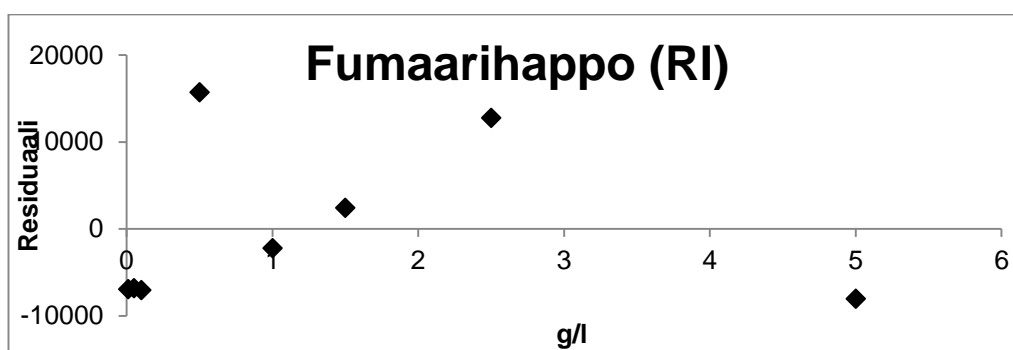
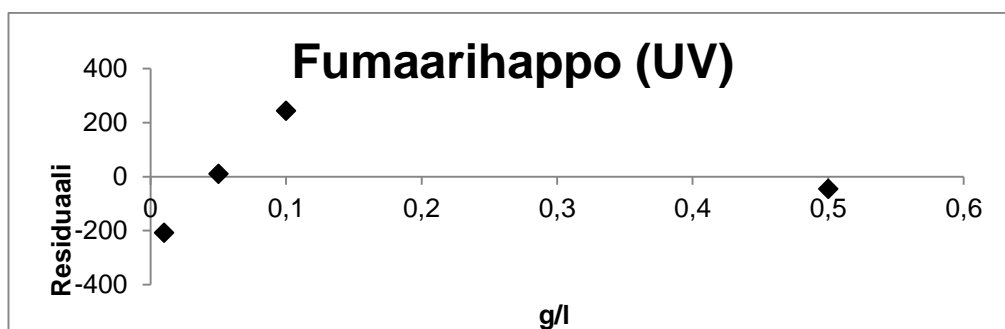
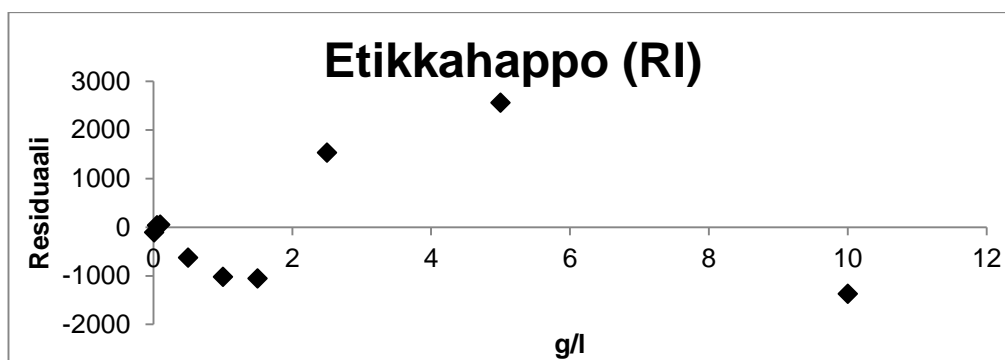


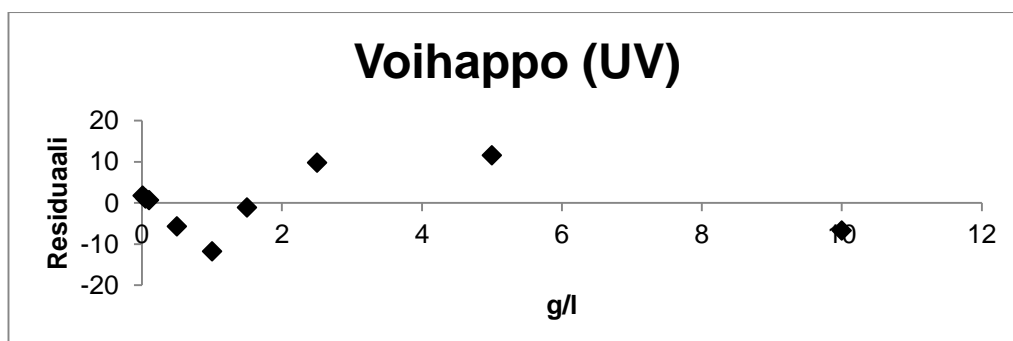
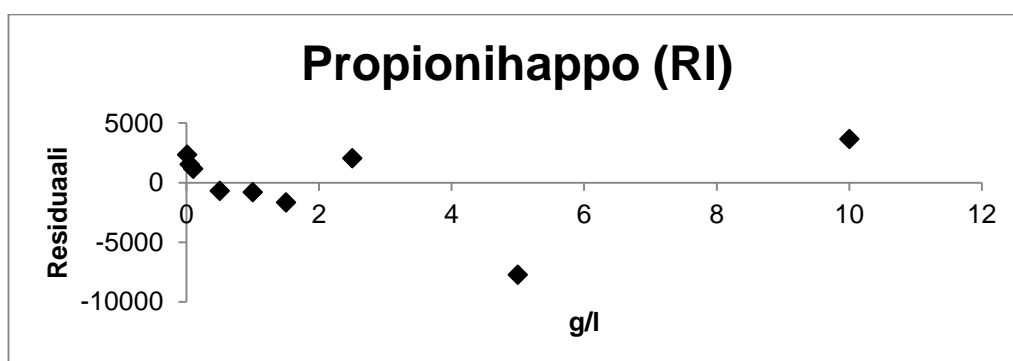
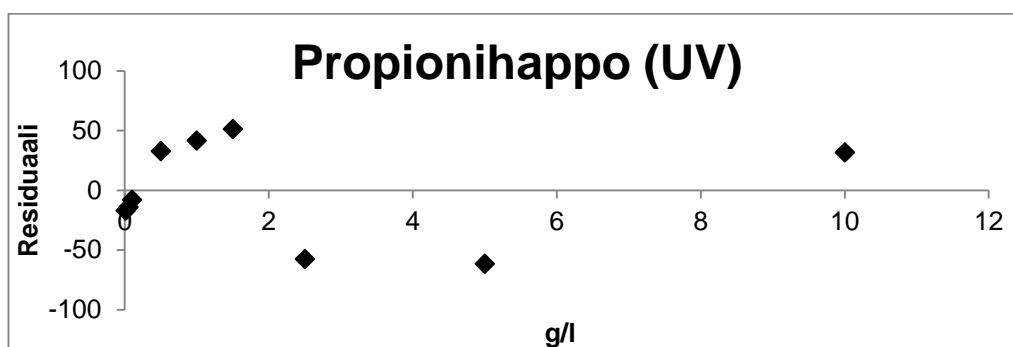
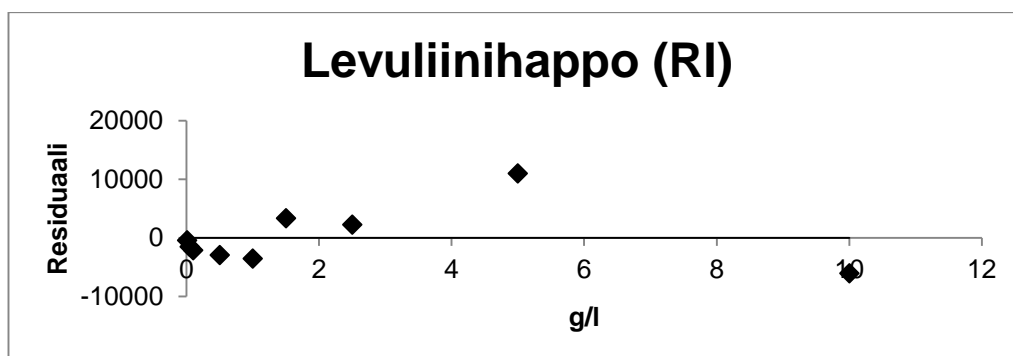


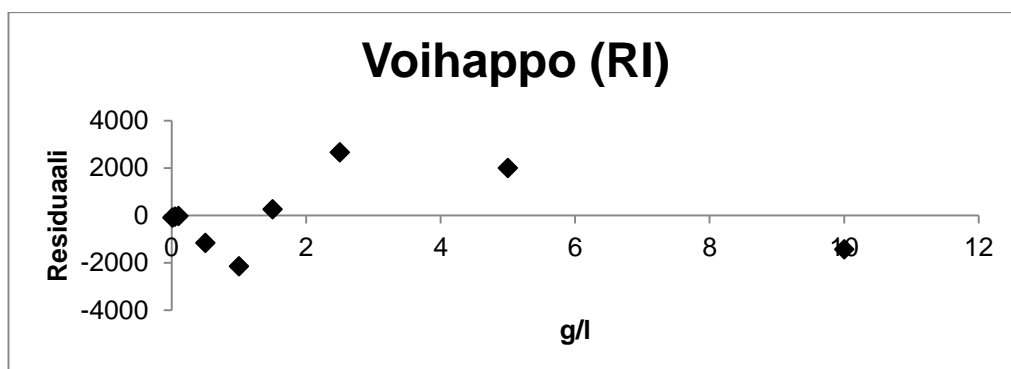






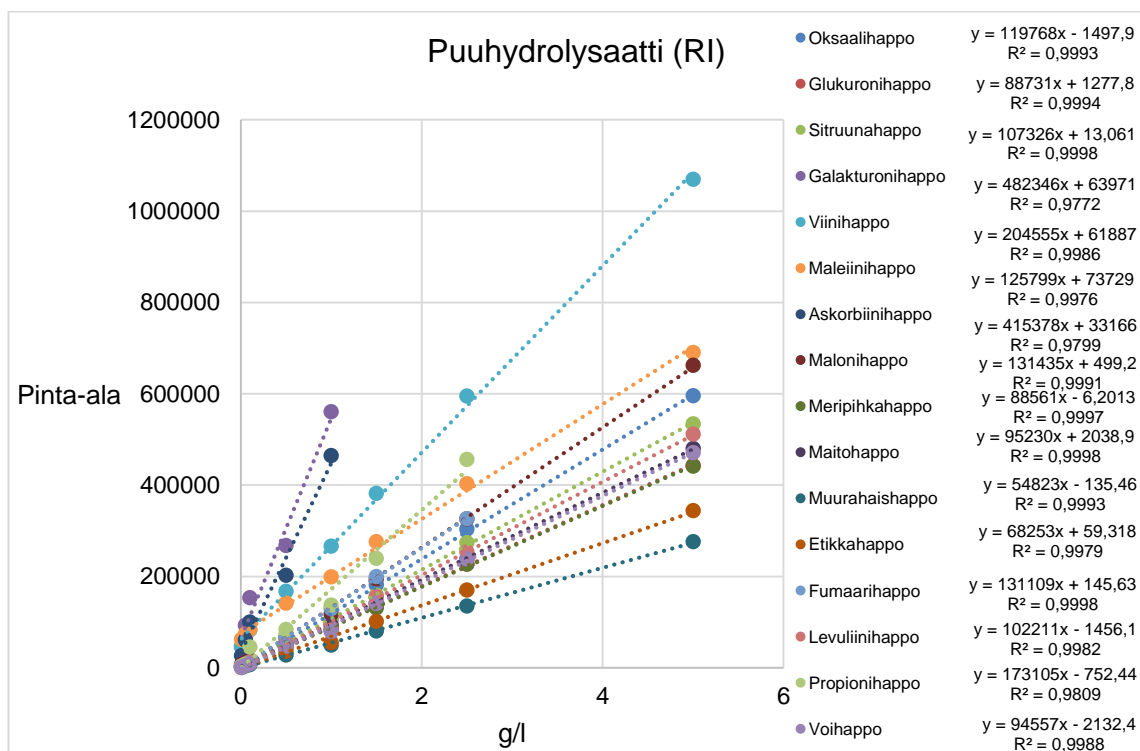
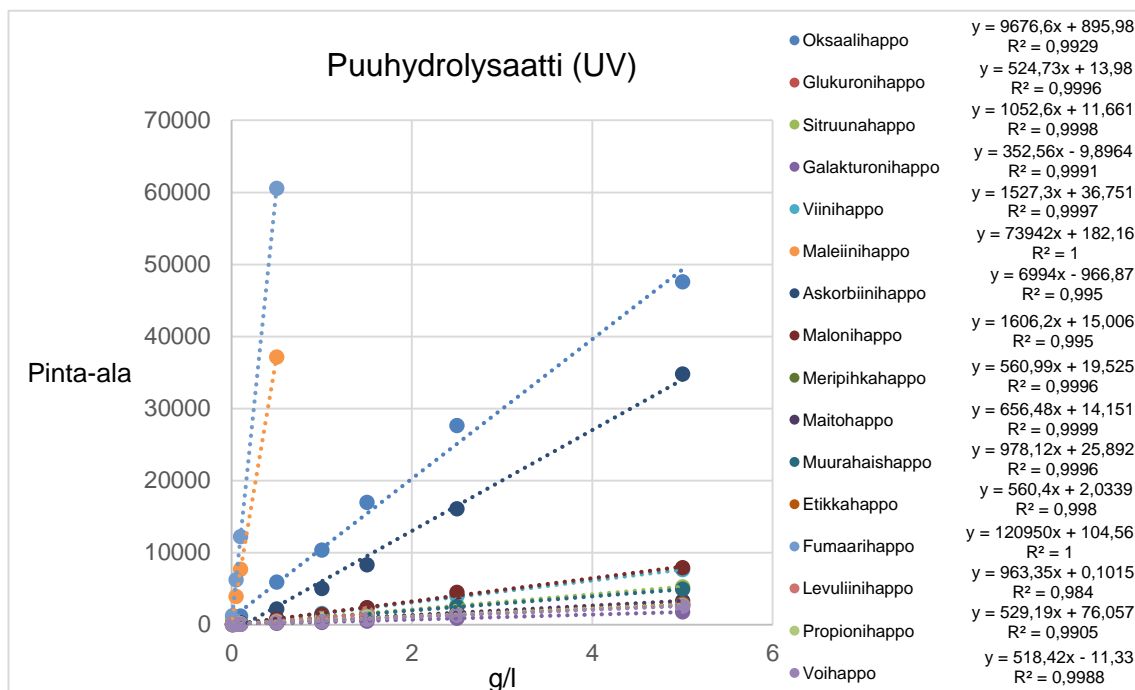


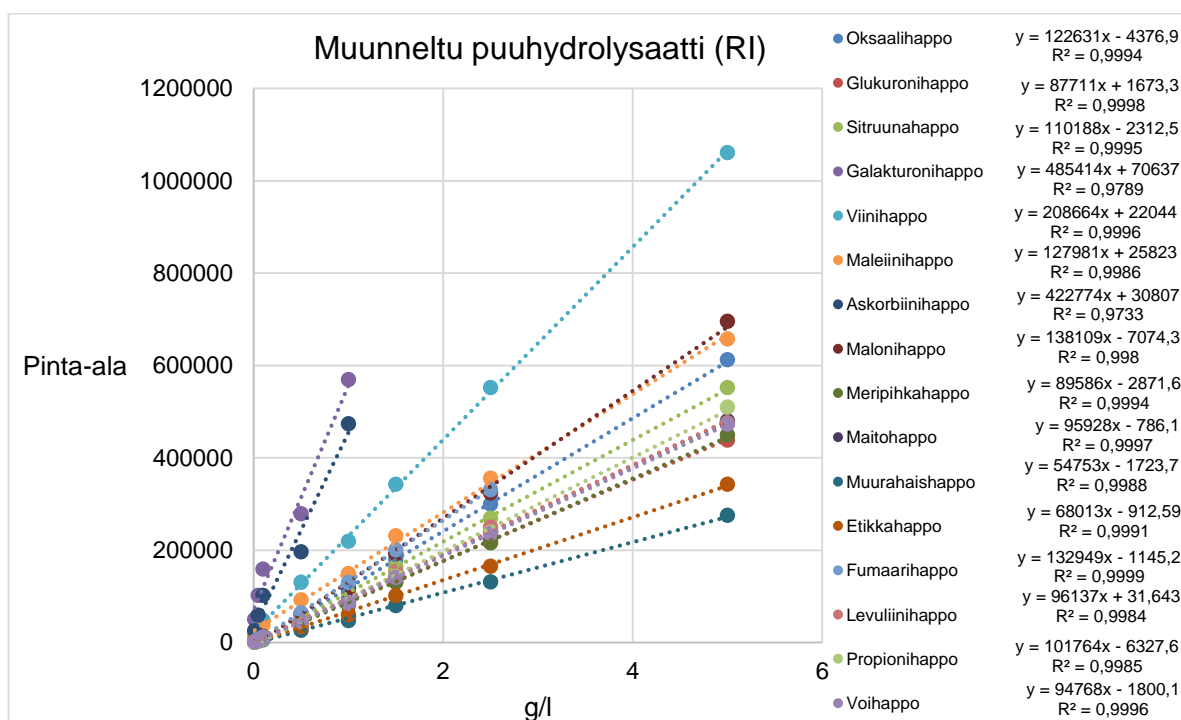
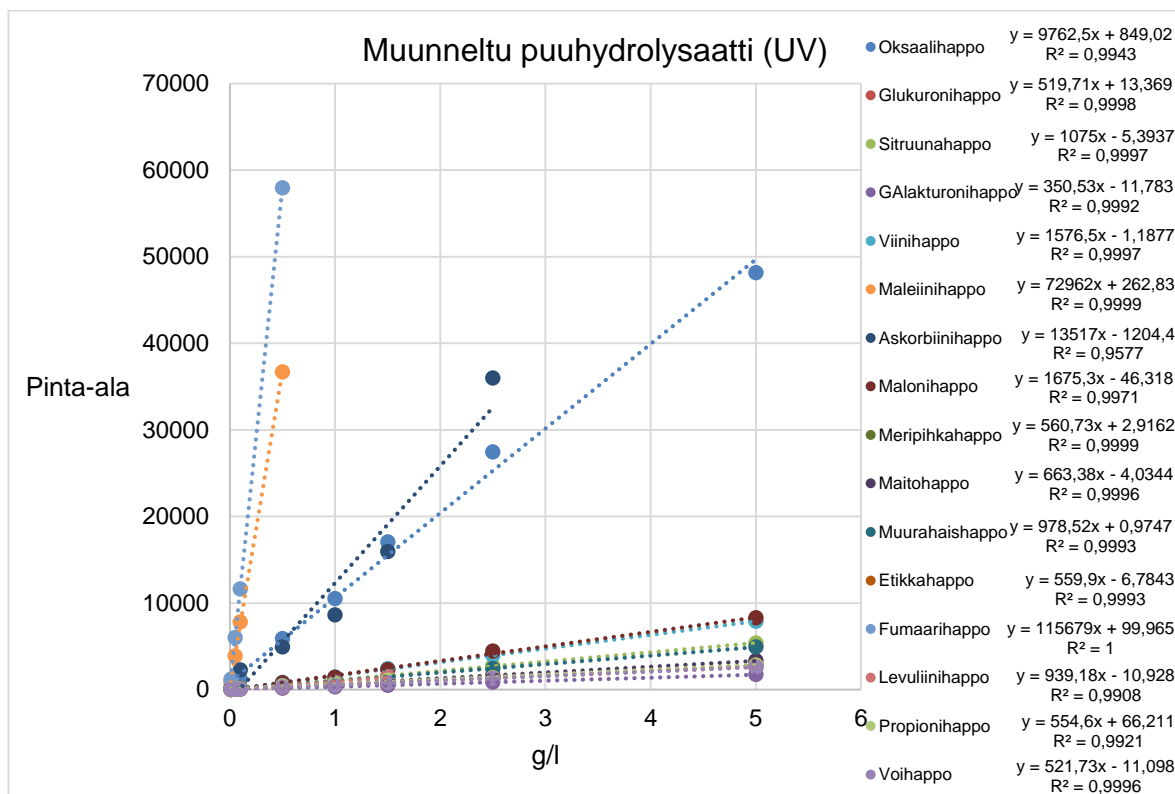


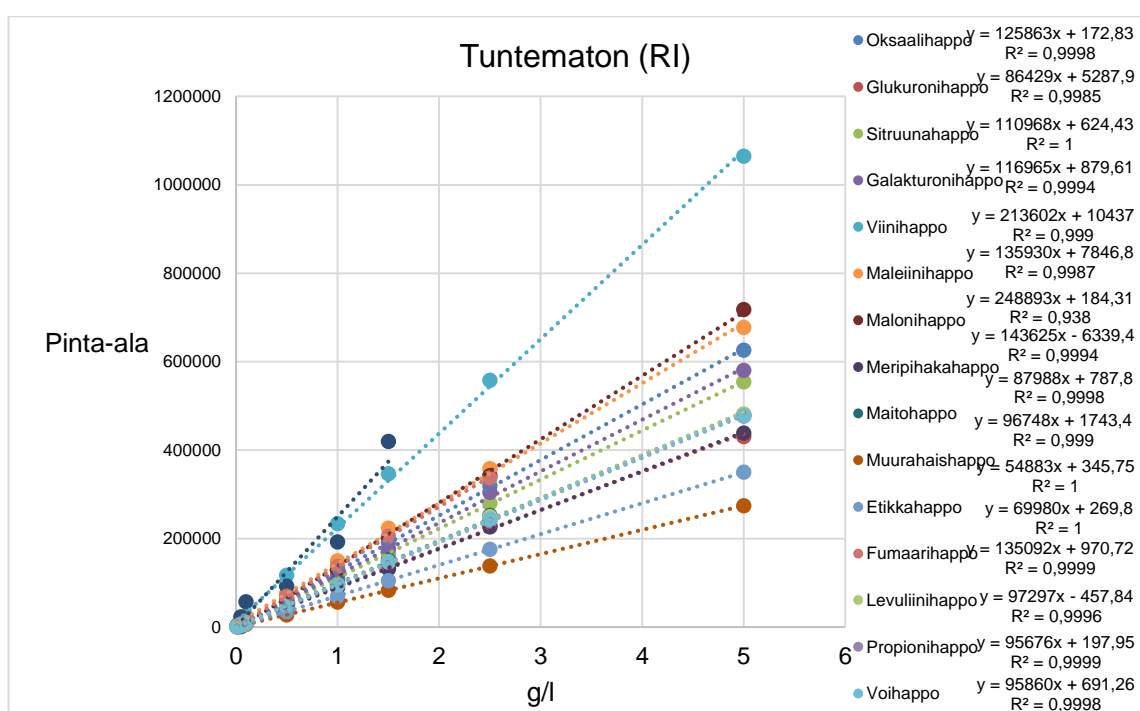
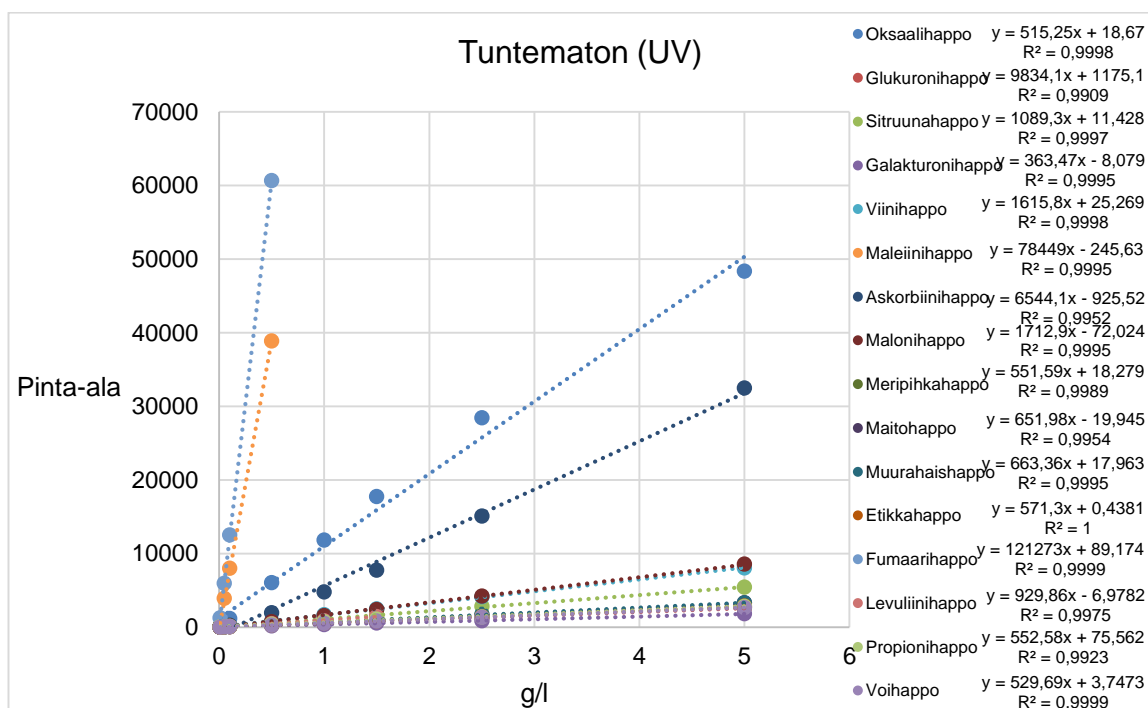


## Standardinlisäysuorat

Happojen standardinlisäysuorat UV- ja RI-detektorilla mitattuna







## Saantokokeet

Happojen saantokokeiden keskiarvot x1 ja x10 laimennettuihin näytteisiin

Puuhydrolysaatti								
Happo	UV (%)				RI (%)			
	Lisäys 500 ppm		Lisäys 1000 ppm		Lisäys 500 ppm		Lisäys 1000 ppm	
	X1	X10	X1	X10	X1	X10	X1	X10
Oksaalihappo	45	105	65	95	138	132	113	113
Glukuronihappo	145	135	135	120	231	142	175	122
Sitruunahappo	130	115	108	107	150	116	120	106
Galakturonihappo	154	125	133	114				90
Viinihappo	146	119	120	108	226	304	130	218
Maleiinihappo	164	160	120	122	213	213	103	254
Askorbiinihappo	35	47	48	64		70	349	62
Malonihappo	165	65	108	88	90	153	64	132
Meripihkahappo	172	128	162	111	154	118	112	86
Maitohappo	163	137	137	115	147	136	110	113
Muurahaishappo	148	131	111	108	175	136	126	114
Etikkahappo	130	131	92	108	143	139	100	115
Fumaarihappo	173	169	139	138	117	106	106	100
Levuliinihappo	348	352	291	125	128	135	89	115
Propionihappo	120	114	111	124	114	100	100	96
Voihappo	96	104	96	97	109	101	97	97



Muunneltu puuhydrolysaatti								
Happo	UV (%)				RI (%)			
	Lisäys 500 ppm		Lisäys 1000 ppm		Lisäys 500 ppm		Lisäys 1000 ppm	
	X1	X10	X1	X10	X1	X10	X1	X10
Oksaalihappo	90	108	84	97	115	117	110	107
Glukuronihappo	138	131	124	120	108	130	136	118
Sitruunahappo	118	114	102	105	122	113	102	104
Galakturonihappo	133	112	115	111	122	90		92
Viinihappo	128	115	112	108	183	155	151	126
Maleiinihappo	161	162	121	121	186	209	145	149
Askorbiinihappo	50	68	47	73	274	63		66
Malonihappo	125	114	105	108	43	120	108	106
Meripihkahappo	144	92	127	85	120	125	106	83
Maitohappo	132	115	109	103	138	102	107	104
Muurahaishappo	138	121	109	108	131	118	109	110
Etikkahappo	142	115	95	104	116	121	100	108
Fumaarihappo	169	172	140	142	106	106	103	114
Levuliinihappo	292	167	276	240	105	112	94	91
Propionihappo	118	128	123	120	106	101	96	93
Voihappo	105	99	113	95	106	103	99	97

Tuntematon								
Happo	UV (%)				RI (%)			
	Lisäys 500 ppm		Lisäys 1000 ppm		Lisäys 500 ppm		Lisäys 1000 ppm	
	X1	X10	X1	X10	X1	X10	X1	X10
Oksaalihappo	111	106	95	97	118	102	102	104
Glukuronihappo	135	124	120	116	132	110	117	112
Sitruunahappo	116	108	98	101	113	95	98	99
Galakturonihappo	126	114	114	110	112	91	100	98
Viinihappo	120	113	107	102	116	96	102	98
Maleiinihappo	162	160	117	122	118	111	99	104
Askorbiinihappo	76	67	80	84	61	48	65	69
Malonihappo	107	110	116	105	105	91	97	98
Meripihkahappo	115	104	97	93	107	91	98	91
Maitohappo	106	99	89	95	111	91	95	97
Muurahaishappo	106	101	98	96	112	92	103	101
Etikkahappo	105	104	92	98	109	94	97	102
Fumaarihappo	181	173	142	142	112	112	105	104
Levuliinihappo	327	323	302	308	103	87	97	96
Propionihappo	141	115	119	112	104	86	95	83
Voihappo	104	99	92	95	103	88	95	96